

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Michaela Hlavatá

PRAHA

2006

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**

**PRODUKTY LIPIDOVÝCH A
PROTEINOVÝCH PEROXIDACÍ
U PACIENTŮ V SEPSI**

Michaela Hlavatá

ŠKOLITEL: Doc. RNDr. František Novák, CSc.

PRAHA

2006

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Františka Nováka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala v seznamu literatury.

Místo a datum: *Praha 30. 8. 2006*

Podpis: *Michala Klavara'*

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc. a Doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za odborné vedení a za cenné připomínky a podněty, které mi poskytli při zpracovávání mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala MUDr. Františku Novákovi za konzultaci v otázkách medicíny a paní Jitce Bartíkové za pomoc při vyhledávání vhodných pacientů a kontrolování jejich zdravotního stavu.

Rovněž bych na tomto místě chtěla poděkovat Prof. MUDr. Aleši Žákovi, DrSc. za vytvoření podmínek k řešení problematiky zpracovávané v rámci této diplomové práce v laboratořích IV. interní kliniky 1. lékařské fakulty UK.

Poděkování patří také mým rodičům za podporu a zázemí, které mi vytvořili pro absolvování vysokoškolského studia a k vypracování této práce.

Tato diplomová práce vznikla v laboratořích IV. interní kliniky 1. Lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze ve spolupráci s MUDr. Františkem Novákem z oddělení akutní medicíny.

OBSAH

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
2. SEZNAM POUŽITÝCH POJMŮ	9
3. ÚVOD.....	10
4. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
4.1 Volné radikály a reaktivní sloučeniny kyslíku	11
4. 1. 1. Reaktivní sloučeniny kyslíku.....	11
4. 1. 2. Reaktivní sloučeniny dusíku.....	13
4. 1. 3. Vliv reaktivních forem kyslíku a dusíku na biomolekuly.....	15
4. 2. Antioxidační systém a antioxidační kapacita.....	16
4.3. Oxidační stres	19
4. 3. 1. Seps, klinický význam seps.....	19
4.3.1.1 Skorovací systémy v intenzivní péči.....	20
4. 3. 2. C – reaktivní protein, prokalcitonin a seps	21
4. 4. Lipidové a proteinové hydroperoxydy.....	23
4. 4. 1. Lipidové hydroperoxydy	23
4. 4. 1. 1. Stanovení produktů lipidových peroxidací.....	26
4. 4. 2. Proteinové hydroperoxydy.....	30
4. 4. 2. 1. Stanovení proteinových hydroperoxydů.....	33
4.5. Konjugované dieny	34
4. 5. 1. Stanovení konjugovaných dienů.....	34
5. CÍL PRÁCE	35
6. MATERIÁL A METODY	36
6.1. Parametry klinické studie.....	36
6.1.1. Kritéria výběru pacientů	36
6. 2. Materiál a metody	40
6. 2. 1. Použité chemikálie a přístroje.....	40
6. 2. 2. Preanalytické zpracování vzorků	42
6. 2. 3. Princip stanovení lipidových a proteinových hydroperoxydů.....	44
6. 2. 3. 1. Stanovení koncentrace lipidových hydroperoxydů metodou M-PCA-FOX	45

6. 2. 3. 2. Stanovení koncentrace proteinových hydroperoxidů metodou G-PCA-FOX	46
6. 2. 4. Stanovení konjugovaných dienů	47
6. 2. 5. Stanovení klinicko-biochemických parametrů vzorků	48
6. 2. 6. Statistické zpracování výsledků	48
7. VÝSLEDKY	49
7.1. Optimalizace podmínek pro stanovení lipidových hydroperoxidů metodou M-PCA-FOX	49
7.2. Optimalizace podmínek pro stanovení proteinových hydroperoxidů metodou G-PCA-FOX	53
7.3. Stanovení koncentrace produktů lipidových a proteinových peroxidací	56
7. 3. 1. Klinicko-biochemické parametry u osob zařazených do klinické studie	56
7. 3. 2. Koncentrace lipidových hydroperoxidů	57
7. 3. 3. Koncentrace proteinových hydroperoxidů	60
7. 3. 4. Koncentrace konjugovaných dienů	63
7. 3. 5. Klinicko-biochemické parametry a produkty lipidových a proteinových peroxidací v závislosti na věku	66
7. 3. 6. Klinicko-biochemické parametry v závislosti na pohlaví	67
7. 3. 7. Zkoumané parametry v závislosti na zdroji sepse	68
8. DISKUSE	69
9. SHRUTÍ	73
10. SEZNAM LITERATURY	74

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	ambulantní kontrola
apoA-I	apoprotein A-I
APACHE II	Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation skóre hodnotící zdravotní stav
BHT	3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluene (C ₁₅ H ₂₄ O) butylhydroxytoluen
CAT	katalasa
CD	konjugovaný dien
CDC	Centers for Disease Control
CRP	C-reaktivní protein
G-PCA-FOX	guanidine–perchloric acid–ferric–xylenol orange guanidin-kyselina chloristá-Fe ³⁺ -xylenolová oranž
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
HDL	High Density Lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
HPLC	High Performance Liquid Chromatography vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Low Density Lipoprotein lipoprotein o nízké hustotě
LOOH	lipidový hydroperoxid
LPS	lipopolysacharid
IL-1	interleukin 1
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome syndrom multiorgánové dysfunkce
M-PCA-FOX	methanol–perchloric acid–ferric–xylenol orange methanol-kyselina chloristá-Fe ³⁺ -xylenolová oranž
NK	neseptičtí kriticky nemocní – kontrolní skupina
PCT	prokalcitonin

POOH	proteinový hydroperoxid
RNS	Reactive Nitrogen Species reaktivní sloučeniny dusíku
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species Reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku
ROS	Reactive Oxygen Species reaktivní sloučeniny kyslíku
RSD	Relative Standard Deviation relativní směrodatná odchylka
S	septický pacient
SD	Standard Deviation směrodatná odchylka
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SOD	superoxiddismutasa
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assesment skore hodnotící septický stav
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances Sloučeniny reagující s kyselinou thiobarbiturovou
TBA	kyselina thiobarbiturová
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
VFN	Všeobecná Fakultní Nemocnice
VLDL	Very Low Density Lipoprotein lipoprotein o velmi nízké hustotě
VR	volné radikály
XOD	xanthinoxidasa
XO	Xylenol Orange xylenolová oranž

2 SEZNAM POUŽITÝCH POJMŮ

Alopurinol	účinná látka např. léčiva Milurit, má antioxidační účinky - je inhibítorem xanthinoxidasy
Arytmie	porucha srdečního rytmu
Atherosklerosa	forma kornatění tepen, vyznačující se tvorbou atheromatosních plátů
Diabetes Mellitus	diabetes, cukrovka; onemocnění způsobené poruchou regulace glykemie hormonem inzulinem
Fagocyt	bílá krvinka likvidující škodlivý mikroorganismus
Farmakologická dávka	dávka doplňku výživy (např. vitamin C, E), která je vyšší než jeho doporučená denní dávka
Hypoperfuse	snížené zásobování tkání nebo orgánů krví
Hypotense	snížený krevní tlak (systolický tlak nižší než 90 mmHg)
Hypoxie	snížení obsahu kyslíku ve tkáních
Ischemie	místní nedokrevnost tkáně nebo orgánu při omezení přívodu okysličené krve
Katetr	tenká hadička z inertního materiálu [polyethyleny, silikonový kaučuk aj.], která se zavádí do horní duté žíly (vena cava superior) při úplné parenterální výživě apod.]
Makrofág	buňka specializovaná na pohlcování cizorodých částic (např. odumřelých buněk)
Mortalita	úmrtnost
Patofysiologie	nauka o chorobných pochodech a změnách funkcí organismu v průběhu nemoci
Perfuse	průtok krve tkání, orgánem

3 ÚVOD

Oxidační stres a antioxidační kapacita jsou stále častěji diskutovaným tématem v řadě oblastí lékařství, mimo jiné také v akutní medicíně. Bylo prokázáno, že oxidační stres je jednou z možných příčin řady onemocnění, jako např. diabetes mellitus [1], cévních onemocnění [2] a septického šoku [3]. Za fyziologického stavu vzniká 90 % reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (RONS, Reactive Oxygen and Nitrogen Species) během procesu získávání energie - při oxidativní fosforylaci v mitochondriích. Oxidační stres nastává v okamžiku, kdy množství RONS, které v organismu vznikají, překročí množství, které je organismus schopný sám pomocí antioxidačních systémů eliminovat. Přebytečné množství RONS může pak způsobit poškození buněčných lipidů, což vede k desintegraci membrán. Reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku poškozují buňky oxidací jejich nukleových kyselin a intracelulárních proteinů, poškozují DNA nebo inhibují její normální funkci [4].

Nejčastější příčinou zvýšené tvorby RONS je aktivace imunitního systému, ke které dochází při proniknutí antigenů do organismu. Typickým projevem aktivace imunitního systému je zánět, který je významným fyziologickým procesem, a je nezbytný pro obranyschopnost organismu. V případě, že se jedná o tzv. lokální zánět, imunitní systém organismu se s tímto zánětem dokáže vypořádat. Pokud se zánět rozšíří, imunitní systém ztrácí kontrolu nad probíhajícím zánětem a dojde k aktivaci systémové odpovědi (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome). K aktivaci SIRS dochází například po transplantaci srdečních chlopní a kloubních náhrad, po operačních zákrocích nebo po popálení [5]. Antioxidační systémy organismu nestačí kompenzovat nadprodukcí ROS a RNS a dochází k poškození buněk. Systémová odpověď SIRS je často spojena se syndromem multiorgánové dysfunkce (MODS, Multiple Organ Dysfunction Syndrome), kdy dochází k selhávání orgánů. Bez vnější terapeutické intervence nemůže být pak udržena homeostasa organismu [6].

Sepse je jednou z velmi častých příčin úmrtí kriticky nemocných pacientů [7].

4 LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Volné radikály a reaktivní sloučeniny kyslíku

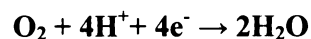
Výzkumy posledních let potvrdily, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních sloučenin kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) a reaktivních sloučenin dusíku (RNS, Reactive Nitrogen Species). Jsou to látky, které velmi snadno reagují s biologickými strukturami – např. lipidy (hlavně mastnými kyselinami), aminokyselinami, s řadou nízkomolekulárních metabolitů a koenzymů .

Za reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku považujeme jednak některé jejich sloučeniny (např. H₂O₂, HNO₂), a dále neutrální molekuly, atomy, sloučeniny i ionty, které mají nepárový elektron – volné radikály. Ty mohou dále v molekulách vznikat trojím způsobem: homolytickým štěpením, oxidací a redukcí. Vzorec radikálů označujeme tečkou, která symbolizuje volný elektron.

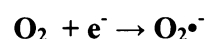
Tyto látky mají značný fyziologický a patologický význam. Jsou významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za některých podmínek (např. oxidační stres) jsou toxické, mohou organismus poškodit nebo usmrtit, a proto jsou stále častějším předmětem zájmu lékařského výzkumu [8].

4. 1. 1 Reaktivní sloučeniny kyslíku

Během buněčného dýchání dochází v respiračním řetězci k redukcí tripletového nebo singletového kyslíku čtyřmi elektrony na 2 molekuly vody:



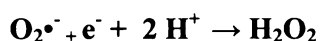
Během redukce vznikají ROS. Produktem jednoelektronové redukce kyslíku je **superoxidový aniontový radikál** [8].



Denně vyprodukuje každá buňka okolo 10¹⁰ molekul superoxidu. Kromě mitochondriálního respiračního řetězce existují ještě další, endogenní zdroje reaktivních

molekul superoxidu $O_2^{\bullet-}$. K celkové tvorbě $O_2^{\bullet-}$ v organismu přispívají zejména leukocyty, které superoxidový aniontový radikál produkují při setkání s patogeny (např. mikroorganismy). Vnější zdroj molekul $O_2^{\bullet-}$ je zejména cigaretový kouř [9].

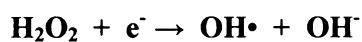
Pokud je k dispozici další elektron, pak produktem (dvouelektronové) redukce kyslíku je **peroxid vodíku H_2O_2** .



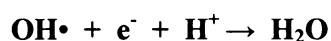
Peroxid vodíku není radikál, ale aktivně se tvorby radikálů účastní. Sám o sobě je poměrně stabilní, difunduje přes membrány podobným způsobem jako voda. V přítomnosti kationů přechodných kovů v nižším oxidačním stupni (Fe^{2+} , Cu^+) se H_2O_2 redukuje za vzniku vysoce toxického hydroxylového radikálu (Fentonova reakce) [10].



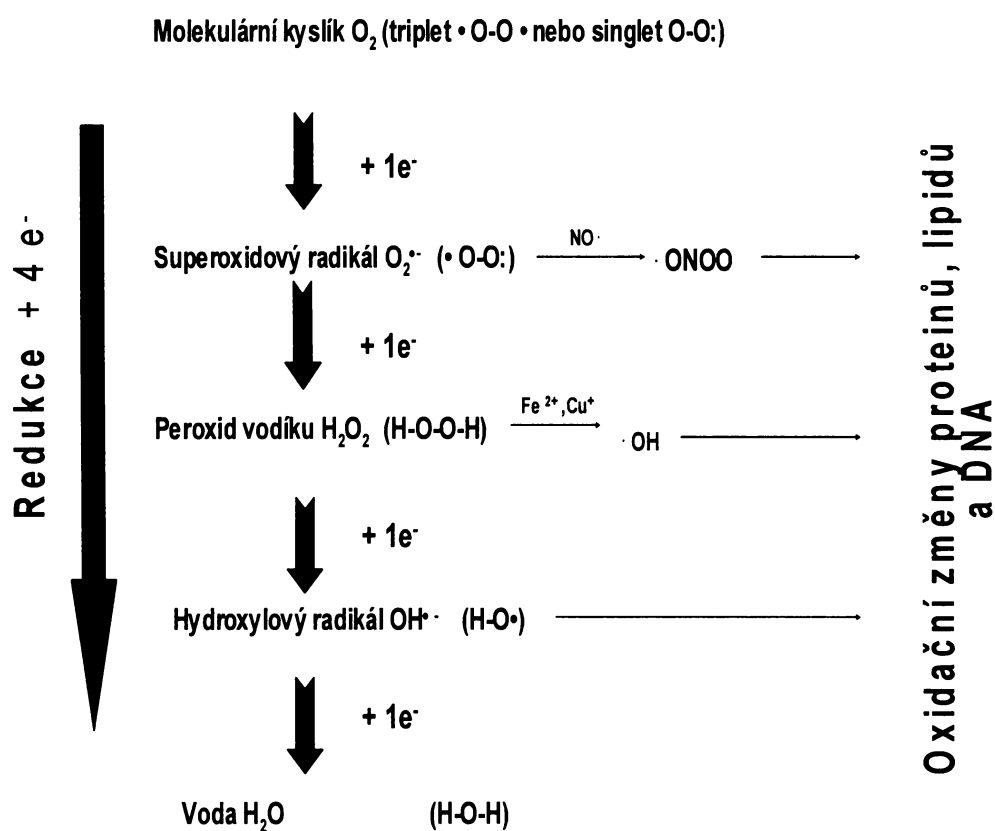
Pokud je k dispozici třetí elektron, peroxid vodíku se rozpadne na vodu a hydroxylový radikál $OH\bullet$. Hydroxylový radikál je velmi silným oxidačním činidlem, které získává elektron z nenasycených mastných kyselin, hydroxyluje aminokyseliny a base nukleových kyselin.



Čtvrtý elektron redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody [8,11]:



Zmíněná čtyřelektronová redukce molekuly atmosférického kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života. Tato reakce je součástí dýchacího řetězce, probíhá v aktivním centru cytochromoxidasy, umožňuje transformaci energie chemických vazeb do ATP. Reaktivní sloučeniny kyslíku vázané do aktivního centra nejsou na rozdíl od volných ROS škodlivé; volné ROS snadno reagují se sousedními molekulami nebo z nich získávají elektron a tím je aktivují [8].



Schema : 1. Redukce molekuly kyslíku a vznik RONS

3O_2 – tripletový kyslík, 1O_2 - singletový kyslík, $O_2^{\bullet-}$ - superoxid, OH^{\bullet} - hydroxylový radikál, NO^{\bullet} – oxid dusnatý, $ONOO^-$ – peroxyinitrit, e^- - elektron

4. 1. 2 Reaktivní sloučeniny dusíku

Reaktivní sloučeniny dusíku jsou stejně jako ROS tvořeny v buňkách organismu a díky své vysoké chemické reaktivitě a nízké selektivitě jsou schopny vážně poškodit buňky, tkáň i organismus jako celek [12]. Destruktivní funkce RNS je pevně spjata s ROS. Kromě NO^{\bullet} patří mezi RNS i N_2O_3 , NO_2 a $OONO^{\bullet}$.

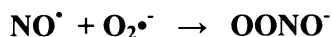
Oxid dusnatý (NO^{\bullet}) je jednoduchá molekula s lichým celkovým počtem elektronů, a proto vystupuje jako radikál. Oxid dusnatý se syntetisuje v mitochondriích pomocí mitochondriální NO -synthasy poměrně složitým enzymovým mechanismem; tento enzym patří mezi klíčové mitochondriální enzymy [13]. *In vivo* NO^{\bullet} reaguje s většinou biomolekul

včetně kyslíku velmi pomalu, protože jeho difuze do krve a inaktivace hemoglobinem je mnohem rychlejší:



Podstatně rychleji NO^\bullet v organismu reaguje s jinými radikály a přechodnými kovy.

Peroxynitrit (OONO^-) vzniká NO^\bullet se superoxidem $\text{O}_2^{\bullet-}$. Tato reakce má z patologického hlediska největší význam.



Peroxynitrit je toxický a má oxidační účinky. Fysiologické pH není pro vznik peroxynitritu vhodné díky nízké koncentraci NO^\bullet a zvláště pak nízké koncentraci superoxidu. Za tohoto pH se protonovaný peroxynitrit, vystupující jako kyselina peroxydusitá, rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý:



In vivo je peroxynitrit odpovědný za nitraci a hydroxylaci tyrosinu. Přechodné kovy včetně kovů v aktivních centrech superoxidodismutasy katalysují heterolytické štěpení peroxynitritu na hydroxidový anion a nitroniový kation NO_2^+ , kterému je často připisována schopnost atakovat fenolové skupiny proteinů; může měnit např. tyrosin na 3-nitrotyrosin [8, 14, 15].

Tabulka 1: Reaktivní sloučeniny kyslíku

REAKTIVNÍ SLOUČENINY KYSLÍKU	
volné radikály	látky neradikálové povahy
Superoxid, $\text{O}_2^{\bullet-}$	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroxylový radikál, HO^\bullet	Kyselina chlorná, HClO
Peroxyl, ROO^\bullet	Ozon, O_3
Alkoxyl, RO^\bullet	Singletový kyslík, $^1\text{O}_2$
Hydroperoxyl, HOO^\bullet	

R – organická část molekuly, $^\bullet$ – nepárový elektron, označení radikálu, $^-$ – záporný náboj, označení aniontu

Tabulka 2: Reaktivní sloučeniny dusíku

REAKTIVNÍ SLOUČENINY DUSÍKU	
volné radikály	látky neradikálové povahy
oxid dusnatý, NO [•]	kyselina dusitá, HNO ₂
oxid dusičitý, NO ₂ [•] (monomer)	oxid dusitý, N ₂ O ₃
-	oxid dusičitý, N ₂ O ₄ (dimer)
-	peroxynitrit, ONOO ⁻
-	alkylperoxynitrit, ROONO

R – organická část molekuly, • – nepárový elektron, označení radikálu, + – kladný náboj, označení kationtu

4. 1. 3 Vliv reaktivních forem kyslíku a dusíku na biomolekuly

Reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku mohou atakovat většinu molekul. Cílem RONS bývají nenasycené mastné kyseliny, které jsou důležitými složkami buněčných membrán. Díky tomu dochází k redukci dvojných vazeb a tvorbě reaktivních metabolitů (aldehydy, peroxidy) [8, 16]. Výsledkem může být pozměněná fluidita a změny v propustnosti membrány [8].

Dalším častým cílem ROSN jsou proteiny. Některé RONS mohou oxidovat aminokyselinové zbytky, např. cystein může být oxidován na kyselinu cysteinovou a oxidací prolinu dochází zřejmě k přerušení peptidového řetězce. Pod vlivem RONS proteiny ztrácí svou enzymovou a signální funkci [8, 16].

Dalším významným cílem RONS je DNA, kde mohou způsobit poškození basí, což má za následek mutace nebo inhibice proteosynthesy [8, 17].

4.2 Antioxidační systém a antioxidační kapacita

Antioxidační systém je tvořen celou řadou sloučenin. Mezi tyto látky patří např. enzymy (superoxiddismutasa, katalasa, peroxidasa) a látky s redukujícími účinky, které poskytují radikálu elektron, čímž se samy mění na stabilnější radikál. Mezi další zástupce patří vitamin C, E, ubichinol, glutathion, látky s chelatačními vlastnostmi - transferin, feritin a další. Antioxidanty jsou látky, které chrání buňky před účinkem volných radikálů a dalších reaktivních oxidačních činidel. Ochranu, kterou zprostředkovává antioxidační systém, můžeme rozdělit do tří skupin:

- a) primární antioxidační ochrana je založena na mechanismech bránících tvorbě volných radikálů. Do této skupiny patří molekuly transferinu, feritinu, leukoferinu, které váží ionty přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^+), čímž brání tvorbě hydroxylového radikálu. Dále sem náleží enzymy jako např. katalasa a peroxidasa. Tyto enzymy odstraňují molekuly peroxidu vodíku a tím brání jeho přeměně na hydroxylový radikál. Třetí složkou primární ochrany jsou látky inhibující enzymy a katalysují tvorbu volných radikálů: např. alopurinol inhibuje xantinoxidasu, která katalysuje tvorbu superoxidu.
- b) sekundární antioxidační ochrana tvoří mechanismy, které odstraňují již vzniklé radikály. Do této skupiny patří enzymy katalysující přeměnu např. superoxidu na peroxid vodíku (superoxiddismutasa) a látky s redukčními vlastnostmi – volnému radikálu poskytnou elektron a samy se tak stanou radikály, které jsou však pro organismus mnohem méně nebezpečné.
- c) terciární antioxidační ochrana je zajištěna mechanismy, které odstraňují molekuly poškozené volnými radikály, např. reparační endonukleasy (opravují poškozenou DNA), glutathionperoxidasa (štěpí peroxid vodíku a lipidové peroxidy, čímž brání vzniku reaktivních aldehydů, které by se mohly vázat na různé molekuly a tím je poškodit.)

Nejčastěji však antioxidační systém organismu dělíme na 2 základní složky, a to složku enzymovou a neenzymovou [14]:

- a) Enzymová složka antioxidačního systému organismu je tvořena paraoxonasou, glutathionreduktasou, superoxidodismutasou, katalasou a mnohými dalšími [18]. Kofaktory antioxidačních enzymů jsou obvykle stopové prvky, jako např. selen, zinek, železo, měď a mangan.

- b) Neenzymovou složku antioxidačního systému tvoří glutathion, kyselina močová, transportní proteiny (transferin, feritin, laktoferin, ceruloplazmin, haptoglobin, hemopexin), vitamin C, E a další [14, 19].

Přehled jednotlivých složek je uveden v tabulce 3 a 4 [20].

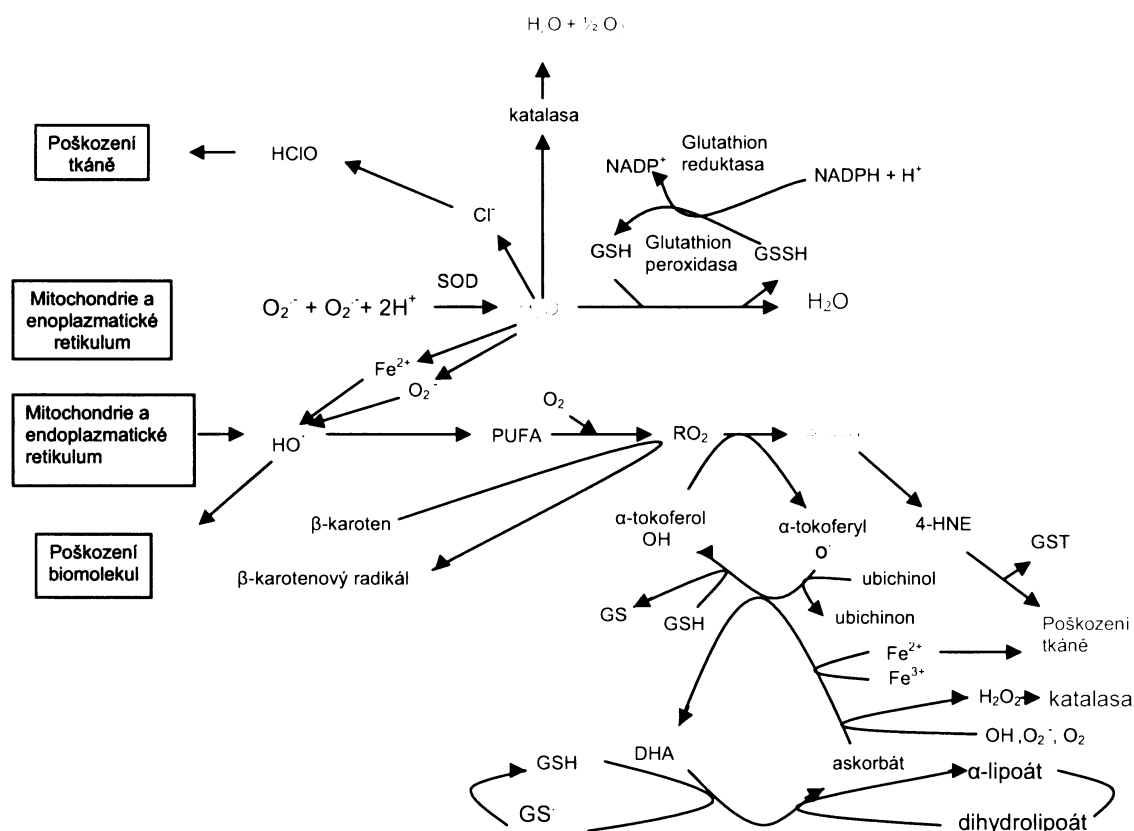
Tabulka 3: Hlavní enzymové složky antioxidačního systému

ENZYMOVÉ SLOŽKY ANTIOXIDAČNÍHO SYSTÉMU		
Intracelulární kompartment	Buněčná membrána	Extracelulární kompartment
katalasa	fosfolipasa	paraoxonasa
superoxiddismutasa		
peroxidasa		
DT-diaforasa		
proteolytické enzymy		

Tabulka 4: Hlavní neenzymové složky antioxidačního systému

NEENZYMOVÉ SLOŽKY ANTIOXIDAČNÍHO SYSTÉMU		
Intracelulární kompartment	Buněčná membrána	Extracelulární kompartment
glutathion	vitamin E	albumin
vazebné proteiny kovů	β – karoten	ceruloplasmin
kyselina askorbová		transferin
opravné systémy DNA		laktoferin
		haptoglobiny
		hemopexin
		vitamin E
		kyselina askorbová
		kyselina močová
		bilirubin

Antioxidační systém je tvořen soustavou antioxidantů, které vzájemně spolupracují. Funkce jednoho antioxidantu často ovlivňuje činnost jiného článku soustavy – viz. schema 2 [8].



Schema 2: Reakční a funkční vztahy mezi antioxidanty

HClO – kyselina chlorná, $O_2^{\cdot -}$ - superoxid, Cl^- - chloridový anion, OH^{\cdot} - hydroxylový radikál, PUFA – vícenenasycené mastné kyseliny, 4-HNE - 4-hydroxy-2-trans-nonenal, SOD - superoxididismutasa, GSH - redukováný glutathion, GSSH - oxidovaný glutathion, NADPH - nikotinamidadenindinukleotid fosfát, DHA - dehydroaskorbát

4.3 Oxidační stres

Oxidační stres nastane v buňce v případě, že hladiny oxidantů v systému překročí kapacitu antioxidačních mechanismů. Oxidační stres bývá vyvolán RONS, které vznikají při řadě metabolických procesů, např. při procesu časné imunitní odpovědi neutrofilů a makrofágů na patogeny v organismu [21].

Buňka pod vlivem oxidačního stresu podléhá řadě charakteristických změn. Následkem oxidačního stresu dochází k peroxidaci lipidů v buněčných membránách, úbytku thiolových skupin v proteinech a také ke značnému poklesu redukovaného glutathionu, který je jedním z hlavních nízkomolekulárních zdrojů thiolových skupin. Následují oxidační změny dalších molekul, což má za následek metabolické vyčerpání a funkční poškození buňky, poškození DNA, a vede až k buněčné smrti [22].

4.3.1 Sepse a její klinický význam

Sepse je syndromem systémové zánětlivé odpovědi, který vzniká jako důsledek infekčního procesu [5, 6, 23]. Tento proces může vést k závažnému poškození tkání. Sepsa může být vyvolána různými mikroorganismy. Definice jednotlivých stupňů sepsy byla formulována v roce 1992:

Sepse: Sepsa se projevuje zvýšenou teplotou nad 38 °C nebo sníženou pod 36 °C, tepovou frekvencí nižší než 90/min, dechovou frekvencí nižší než 20/min, množstvím leukocytů vyšším než 12 000/mm³ nebo naopak nižším než 4 000/mm³, nebo je v organismu přítomno více než 10 % nezralých forem leukocytů [5].

Těžká sepsa: Těžká sepsa je charakterisována kromě již zmíněných klinických příznaků i změnami vědomí či chování, hypoperfusí, dysfunkcí orgánů a hypotensí.

Septický šok: Ve stadiu septického šoku nastává těžká hypotense a hypoxie. Hypotense komplikuje těžkou sepsi při současné resuscitaci tekutinami. Příčinou je alterace mikrocirkulace s následným únikem tekutin do intersticia, tlak krve klesá pod 90 mm Hg. Většina pacientů přežívá pouze krátkodobě, šokový stav může vést k úmrtí během několika hodin [6]. Pokud se podaří pacienta ze šokového stavu vyvést, ve většině případů dochází k rozvinutí příznaků MODS [23].

I přes zlepšení kvality podpůrné intenzivní péče a antibiotické léčby zůstává v posledních dvaceti letech úmrtnost pacientů v sepsi mezi 30 – 40 %. Samotná diagnostika sepsy je velmi obtížná díky nespecifickým počátečním symptomům (horečka,

tachykardie) a různorodým klinickým příznakům (hypoglykemie, kombinované poruchy acido-basické rovnováhy, jako respirační alkalosa a metabolická acidosa, hypotense ...) [24].

Sepsí může vyvolat celá řada infekčních agens, nejčastějším původcem jsou G-negativní a G-positivní bakterie. Z G-positivních bakterií je to hlavně *Staphylococcus aureus*, který je příčinou sepse z osteomyelitidy; *Staphylococcus epidermidis* má vysokou afinitu k povrchům z umělých hmot a tedy infikuje centrální katetry, umělé srdeční chlopně a kloubní náhrady endotoxiny. Dalšími G-positivními bakteriemi jsou bakterie z rodu *Meningococcus*, *Salmonella* aj.

Mezi G-negativní bakterie patří *E. coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Serratia*. G-positivní bakterie z hlediska schopnosti iniciovat vznik septického stavu jsou méně agresivní, tudíž množství G-positivních bakterií nutné k propuknutí sepse je větší než u G-negativních mikroorganismů. Původcem sepse mohou být i plísňe.

Gram-negativní bakterie mají buněčnou stěnu, ve které jsou přítomny lipopolysacharidy a tzv. lipid A, který se váže na imunokompetentní buňky přes receptor CD 14. Tento receptor je v plasmě v solubilní formě nebo vázaný na imunocytech, především na makrofázích. Vzájemná interakce lipidu A a CD 14 vede k iniciaci tvorby cytokinů a stimulaci celé prozáněťové kaskády. Produkovány jsou hlavně TNF α (tumor nekrotisující faktor alfa) a IL-1 (interleukin-1). Důsledkem tohoto procesu je aktivace leukocytů a aktivace komplementu [6].

4.3.1.1 Skorovací systémy v intenzivní péči

Skorovací systémy v intenzivní péči se používají k určení závažnosti zdravotního stavu pacienta, k definování náročnosti péče a také jako prostředek, který umožňuje porovnání léčebných a ošetrovacích postupů.

Skóre APACHE II

Skóre APACHE II (Acute Physiological and Chronic Health Evaluation) je skorovací systém používaný v intenzivní péči. Hodnotí závažnost onemocnění u pacientů starších 16 let. APACHE II skóre je spočítáno do 24 hodin po přijetí pacienta na JIP z hodnot tělesné teploty, středního arteriálního tlaku, srdeční frekvence, frekvence dýchání, arteriálního pH, plasmatické koncentrace sodíku, draslíku, kreatininu, hematokritu, počtu leukocytů a stupně poruchy vědomí hodnoceného dle GCS (Glasgow Coma Scale).

Skore SOFA

Skore SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) je dalším ze skorovacích systémů používaných v intenzivní péči; hodnotí postižení krevního oběhu, centrálního nervového systému, vylučovací a dýchací soustavy a hemokolaguace. Tento skorovací systém je jednoduchý, hodnotí závažnost systémové zánětlivé odpovědi organismu v závislosti na zátěži [25].

Skore APACHE II a skore SOFA jsou považovány za standardní skorovací systémy v intenzivní a resuscitační péči.

4. 3. 2 C-reaktivní protein, prokalcitonin a sepse

C-reaktivní protein (CRP) je proteinem akutní fáze, který byl poprvé objeven v roce 1930 Tillem a Francismem v séru pacientů s pneumonií; je produkován jaterními buňkami a v séru zdravých lidí je přítomen pouze v nízkých koncentracích (≤ 10 mg/l) [26]. V průběhu zánětlivého procesu při bakteriální infekci se hodnoty CRP významně zvyšují a můžeme je detekovat už 3 - 6 hodin po začátku infekce. C-reaktivní protein má význam při monitorování průběhu nemoci, při monitorování a kontrole pooperačních stavů, a již minimálně zvýšené hodnoty (o 2 – 3 mg/l) předpovídají riziko kardiovaskulárního onemocnění [27].

Příčinou sepse je infekce [5,6]; C-reaktivní protein je považován za marker sepse už mnoho let. V posledních letech se ukázalo, že dalším ukazatelem sepse je prokalcitonin (PCT) [28]. V průběhu sepse dochází ke zvýšení hladin obou reaktantů akutní fáze – CRP i PCT. Hladiny CRP se výrazně zvyšují hlavně v počátečních stádiích sepse a orgánové disfunkce; přechod mezi sepsí a těžkou sepsí můžeme pomocí CRP monitorovat jen obtížně, dochází totiž jen k pozvolnému zvyšování jeho hladiny. Ve stadiu těžké sepse a septického šoku dochází k významnému zvýšení hladiny PCT, zatímco v prvotním stadiu sepse nemusí být zvýšení PCT odlišné od jiných klinicky závažných diagnóz [29].

Ke zvýšení hladin PCT i CRP dochází během 3 – 6 hodin od poškození tkáně a maxima dosahují během 12–48 hodin. Hladina PCT reaguje citlivěji na vážnost zdravotního stavu pacienta než hladina CRP, což prokazují jeho zvyšující se hodnoty v závislosti na počtu selhávajících orgánů a na rozvoji sepse [24]. Reaktanty akutní fáze jsou sice citlivé, ale ne zcela specifické z hlediska bakteriální infekce. Hladina CRP se zvyšuje nejen při bakteriálních infekcích, ale k mírnému zvýšení dochází i při virových infekcích, ale i po neinfekčních insultech např. po operacích, po infarktu myokardu, či při akutní

pankreatitidě. Koncentrace PCT také není zcela specifickým parametrem bakteriální infekce, k jejímu zvýšení dochází také z řady neinfekčních příčin. Pokud budeme porovnávat koncentrace CRP a PCT vzhledem k možnosti rozlišení bakteriální a virové infekce, pak je PCT citlivější a specifitější při diferenciaci bakteriálních a neinfekčních příčin zánětu. Z toho vyplývá, že je výhodné v průběhu sepse stanovovat jak množství CRP, tak i množství PCT [24, 30].

4. 4 Lipidové a proteinové hydroperoxydy

Měření organických hydroperoxidů v živých organismech, které byly vystaveny oxidačnímu stresu, je široce využíváno jako indikátoru časného poškození volnými radikály a jinými ROS. Dříve byly mnohem častěji studovány lipidové než proteinové hydroperoxydy. Množství lipidových hydroperoxidů v podobě produktů peroxidace bylo zjišťováno použitím různých technik, které často vedly k rozdílným výsledkům [31]. V posledních letech se ukázalo, že i v proteinech vystavených působení ROS mohou vznikat hydroperoxidové skupiny [32]. Proteinové hydroperoxydy vznikají ve velkých množstvích, podporují tvorbu nových volných radikálů, oxidovaného GSH a inaktivují glutathion reduktasu. Z těchto zjištění vyplývá, že i proteiny jsou důležitými cílovými molekulami ROS v živých organismech [31].

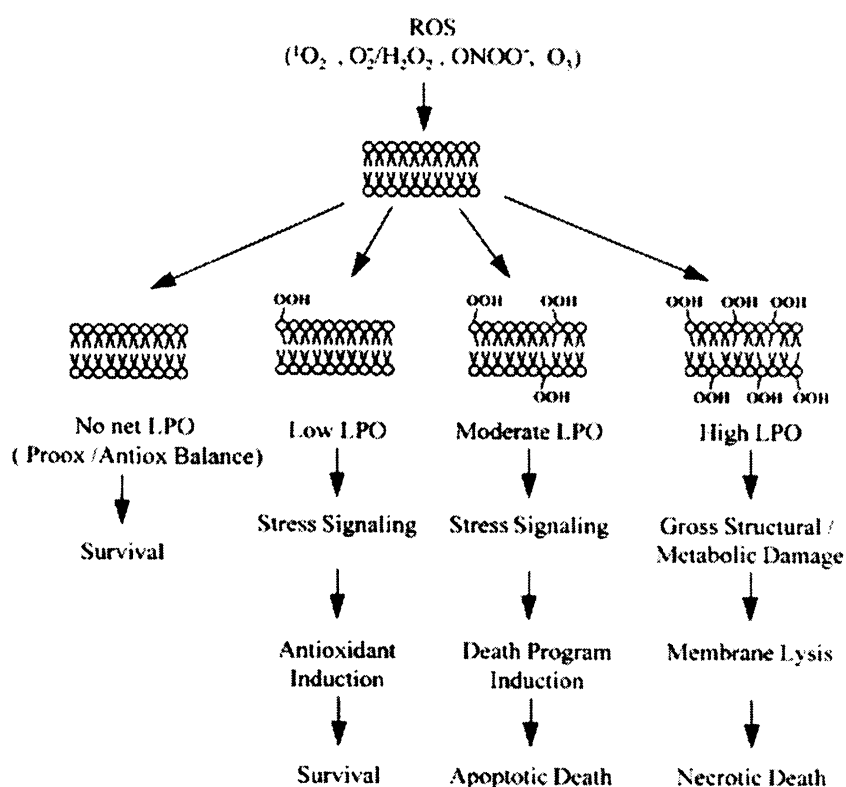
4. 4. 1 Lipidové hydroperoxydy

Reaktivní kyslíkové látky jsou generovány v eukaryotických buňkách během normálních oxidačních dějů nebo při elektronovém transportu v mitochondriích a endoplasmatickém retikulu [33]. Lipidové hydroperoxydy jsou jednou z příčin oxidačního poškození buněčných membrán, lipoproteinů a dalších struktur, které obsahují lipidové složky [34, 35].

Fofolipidy obsahující násobné vazby, glykolipidy a cholesterol v buněčných membránách jsou atakovány ROS, což vede k lipidovým peroxidacím, které jsou degenerativním procesem s patofysiologickými následky [36]. Lipidové peroxidace jsou často spojovány s různými zdravotními obtížemi jako např. s aterosklerosou, s procesy stárnutí kůže, karcinogenesí, ischemicko – reperfusním syndromem. Lipidové hydroperoxydy jsou v biologických systémech generovány fotony nebo vznikají reakcí OH^\bullet (Fentonova reakce) s buněčnými lipidy. Lipidové hydroperoxydy mohou spolu s Fe^{2+} vstoupit do jednoelektronové redukční reakce, během které jsou přeměněny na epoxyperoxidový radikál (OLOO^\bullet), který spustí řetězovou reakci, jež produkuje velké množství dalších lipidových peroxidů. Tato jednoelektronová redukce katalysovaná Fe^{2+} je toxická, neboť velké množství vzniklých LOOH může oxidovat lipoproteiny (např. LDL) [37].

Oxidované LDL jsou příčinou časné aterosklerosy. Lipidové hydroperoxydy asociují s LDL, dojde k modifikaci apoB-100, což zaktivuje makrofágy a dochází k iniciaci tvorby aterosklerotického plaku. Kromě toho mají oxidované LDL chemotaktické a cytotoxické

a mitochondriální glutathionperoxidasa (GPX) a katalasa (CAT). Odstraňují nadměrné množství peroxidu vodíku a tím brání vzniku LOOH. Mezi sekundární systémy chránící buňku před lipidovými peroxidacemi patří nízkomolekulární antioxidanty jako např. α T-OH, které kompetitivně soutěží s lipidy o peroxidové radikály. Do této skupiny můžeme zahrnout i cytosolickou a mitochondriální GPX [37].

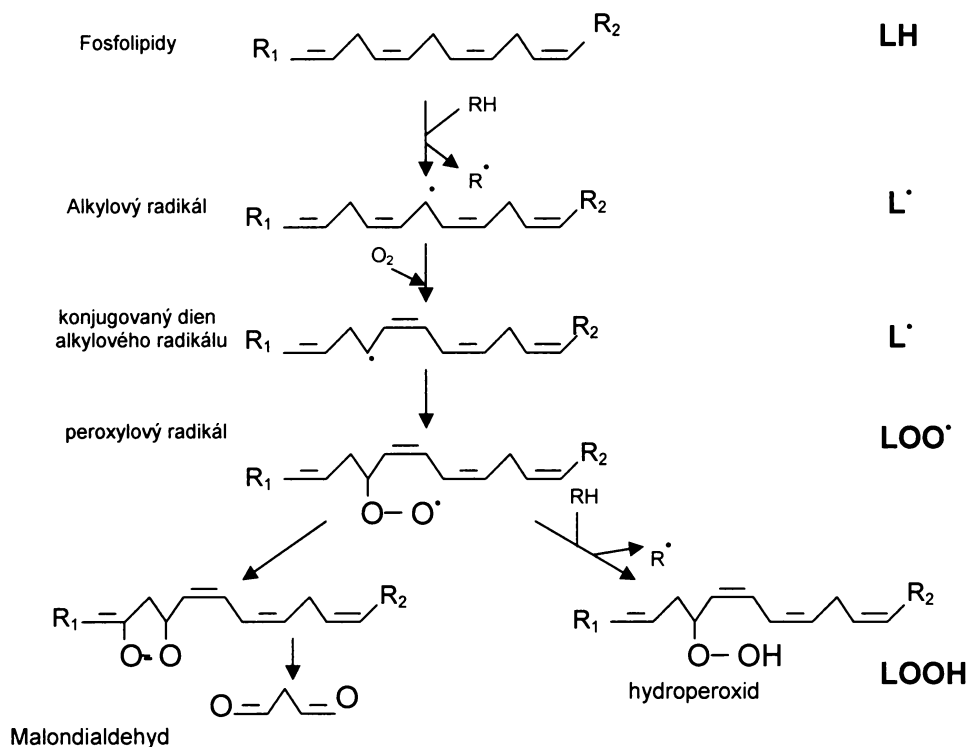


Schema 4: Různé úrovně peroxidace lipidů působením ROS

ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku, 1O_2 - singletový kyslík, O_2^- - superoxid, $ONOO^-$ - peroxyinitrit, O_3 – ozon, LPO - lipiperoxidace

- i) No net LPO – množství ROS a antioxidantů je v rovnováze
- ii) Low LPO – nízká hladina lipidových peroxidací, Stress Signaling – signalizace buněčného stresu, Antioxidant induction – indukce antioxidantů, survival - přežití
- iii) moderate LPO – průměrné množství lipidových peroxidací, Death Program Induction – program indukující smrt, Apoptotic Death – apoptosa
- iv) High LPO – vysoké množství lipidových peroxidací, Gross structural/Metabolic damage – velké strukturální nebo metabolické poškození, Membrane Lysis – lisy membrány, Necrotic Death - nekroza buňky

Neenzymová peroxidace lipidů probíhá níže popsáním způsobem (viz. schéma 5). Touto peroxidací vznikají různé produkty, protože řetězce modifikovaných mastných kyselin se snadno štěpí na kratší, např. ethan a pentan, které vydechujeme, nebo na malondialdehyd a 4-hydroxynonenal, které jsou toxické, pevně se váží na proteiny a mění jejich životnost a funkci. Díky těmto peroxidacím dochází ke změně fluidity membrán a zvyšuje se jejich propustnost pro ionty [8, 39].



Schema 5: Peroxidace nenasyčených mastných kyselin

LH – lipid, *L \bullet* – lipidový radikál, *LOO \bullet* – lipidový alkylperoxidový radikál, *LOOH* – lipidový hydroperoxid

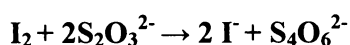
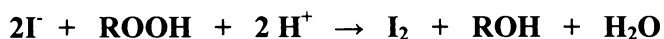
4. 4. 1. 1 Stanovení produktů lipidových peroxidací

Pro měření lipidových hydroperoxidů byla v porovnání s proteinovými hydroperoxidy vyvinuta celá řada metod. Jednotlivé metody se liší svou specifíčností a náročností samotného stanovení LOOH. Většina metod je spektrofotometrická. Mezi neznámější patří jodometrická metoda, která je v řadě publikací uváděna jako referenční metoda pro stanovení lipidových hydroperoxidů [31, 40]. Další metody pro stanovení lipidových

hydroperoxidů využívají oxidaci železnatých iontů na železité v přítomnosti xylenolové oranže – např. M-PCA-FOX, HPLC, amperometrii aj.

Jodometrické stanovení lipidových hydroperoxidů.

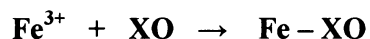
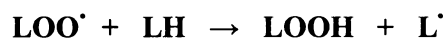
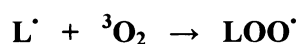
Tato metoda je v celé řadě publikací uváděna jako referenční [41, 42, 43]. Analýza lipidových hydroperoxidů je prováděna v plasmě a její podstatou jsou reakce:



Lipidy jsou z plasmu extrahovány ethylacetátem. Plasmu okyselíme na pH 3,5 a přidáme destilovaný ethylacetát, který obsahuje antioxidační činidlo butylovaný hydroxytoluen (BHT). Organickou fází rozpouštědel promyjeme 1mM kyselinou chlorovodíkovou a vysušíme pod proudem dusíku. Odparek rozpustíme v ethanolu a přidáme směs kyseliny octové a methylchloridu v poměru 3:2 a vodný roztok KI. Poté inkubujeme ve tmě, přidáme 0,35 % roztok CdCl₂, centrifugujeme a proměříme absorbanci při 353 nm. Ve stejné kylvetě pak stanovíme množství uvolněného I₂ zpětnou titrací pomocí Na₂S₂O₃.

Stanovení lipidových hydroperoxidů reakcí Fe²⁺ s xylenolovou oranží

Principem této metody je oxidace železnatých iontů lipidovými hydroperoxy na železité. Železité ionty pak tvoří v kyselém prostředí komplex s xylenolovou oranží, jehož koncentraci můžeme stanovit při 560 nm [40].

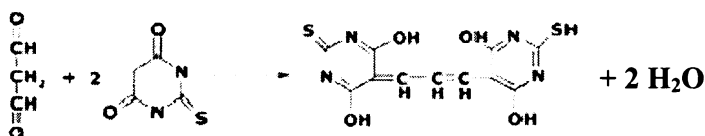


Na základě tohoto reakčního schématu byla vyvinuta celá řada metod, které byly použity pro měření lipidových hydroperoxidů. Jednotlivé metody se vzájemně liší jen málo. Liší se v typu a koncentraci použité kyseliny [40mM H₂SO₄, 25mM H₂SO₄ – metoda FOX, 250mM H₂SO₄, HCl a HClO₄ – metoda PCA-FOX a M-PCA-FOX (methanol-perchloric

acid–ferric–xylenol orange)], koncentrací a přidávaným množstvím xylenolové oranže a železnatých iontů. Některé metody stanovují množství lipidových hydroperoxidů v séru, jiné v plasmě [44, 45, 46, 47].

Stanovení produktů lipidových peroxidací (malondialdehydu) pomocí TBA [42]

Lipidové peroxidace, jak už bylo řečeno, jsou jednou z příčin buněčného poškození. Nenasycené mastné kyseliny jsou peroxidovány, přičemž mj. vznikají i aldehydy jako např. malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal (4-HNE), dále pak hydroperoxy, lipofusciny aj. [48, 49]. Malondialdehyd je jedním z nejčastěji publikovaných markerů lipidových peroxidací v plasmě. Nejčastěji se stanovuje v přítomnosti kyseliny 2-thiobarbiturové (2-TBA). Tuto metodu vyvinul v roce 1959 A. Ottolenghi. Malondialdehyd tvoří s 2-TBA stabilní barevný komplex MDA-TBA₂, čehož se využívá při spektrofotometrickém stanovení [41]:



Reakce proběhne kvantitativně po hodinové inkubaci při 100 °C, poté je vzniklý komplex extrahován do butanolu a jeho koncentrace stanovena spektrofotometricky při 532 nm [49]. Kyselina 2-thiobarbiturová poskytuje s MDA růžově zbarvený komplex; s dalšími sloučeninami (aldehydy, žlučová barviva) poskytuje komplexy zbarvené žlutě až oranžově, které stanovení MDA ruší. Proto se při výpočtu celkové koncentrace MDA v plasmě používá tzv. Allenovy korekce. Měření probíhá při třech vlnových délkách (485, 532, 560) nm, z nichž vypočteme korigovanou absorbanci A_{kor} [50, 51]:

$$A_{kor} = A_{532} - [(A_{560} - A_{485}) * 0,63 + A_{485}]$$

Stanovení malondialdehydu pomocí HPLC

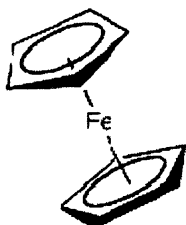
Další metodou používanou pro stanovení malondialdehydu je HPLC [52, 53]. Stanovení volného MDA v biologických vzorcích, buňkách a buněčných frakcích pomocí HPLC je časově nenáročné (10–15 minut) a specifické v porovnání s výše zmíněnou spektrofotometrickou metodou. Pomocí této metody můžeme detekovat i velmi malá množství MDA ve vzorku.

Roztok nebo suspenzi, která obsahuje MDA, okyselíme na pH 6,5–8 a separujeme pomocí HPLC. Detekci provádíme spektrofotometricky při 270 nm, kde má MDA své absorpční maximum. Malondialdehyd identifikujeme porovnáním elučního času s referenčním chromatogramem standardu. [54, 55, 56].

Amperometrické stanovení lipidových hydroperoxidů [57].

Tato metoda je založena na měření katodického proudu, který vzniká při elektrochemické reakci ferricinia. Ferricinium vzniká oxidací ferrocenu lipidovými hydroperoxidy. Metodu provádíme v cele s tříelektrodovým systémem, který zahrnuje uhlíkovou pracovní elektrodu, Ag/AgCl referenční elektrodu a platinovou pomocnou elektrodu. Cella s tříelektrodovým systémem je naplněna pufrům s 0,1 mM ferrocenkarboxylovou kyselinou. V okamžiku, kdy do cely přidáme vzorek, začínáme zaznamenávat nárůst redukčního proudu.

Tato metoda je citlivá, rychlá a není ovlivněna jinými hydroperoxidy. Nevýhodou této metody je citlivost na pH a přítomnost kyslíku, který se také redukuje na pracovní elektrodě.



Obrázek 1: Ferrocen $C_{10}H_{10}Fe$

Stanovení α -tokoferolu pomocí HPLC

Alfa-tokoferol patří mezi nízkomolekulární endogenní antioxidanty stejně jako askorbát (vitamin C); je to antioxidační látka přítomná v membránách díky svému lipofilnímu charakteru. Při peroxidaci lipidů se peroxidy přemění na radikály LOO^{\bullet} , které zneškodní glutathionperoxidasa. Při reakci LOO^{\bullet} a α -tokoferolu se α -tokoferol mění na tokoferylový radikál, který je však stabilnější, tudíž pro organismus méně škodlivý [8].

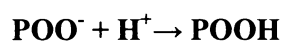
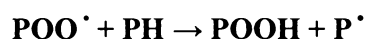
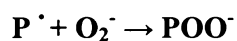
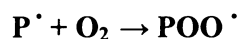
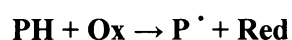
Principem metody je extrakce α -tokoferolu z plasmy systémem rozpouštědel ethanol : voda : hexan v poměru 1 : 1 : 1 a následuje analýza vrchní organické fáze pomocí HPLC s fluorescenční detekcí při 390 nm. Jako mobilní fáze slouží hexan/1% ethanol [58, 59].

Stanovení lipidových hydroperoxidů pomocí fluorescence

Tato metoda je založena na oxidaci dichlorfluorescinu lipidovým hydroperoxy na dichlorfluorescein. Je to metoda velmi citlivá, umožňuje detekovat malá množství LOOH [60].

4. 4. 2 Proteinové hydroperoxy

Přestože je většina publikací zaměřena na stanovení lipidových hydroperoxidů, v posledních letech vznikla celá řada prací, které poukazují, že i proteinové peroxidace mají velký význam [32]. Majoritní postavení při proteinových peroxidacích má OH^\bullet . Tyto radikály mohou být generovány γ -zářením, redukcí peroxidu vodíku v přítomnosti Fe^{2+} nebo Cu^{2+} , nebo reakcí ozonu s fenolickými látkami [61].



P – protein, Ox – oxidační činidlo, Red – redukována forma Ox, X' – jiný radikál

Proteiny reagují s OH^\bullet a dalšími ROS za vzniku proteinového radikálu, který může v dalším kroku reagovat s kyslíkem nebo superoxidovým radikálem $\text{O}_2^{\bullet -}$ za vzniku POO^- a POO^\bullet . Proteinový peroxid-radikál (POO^\bullet) má poměrně dlouhý poločas života; reaguje s další molekulou proteinu, čímž iniciuje řetězovou reakci. K terminaci, která ukončí průběh řetězové reakce, dojde při reakci POO^\bullet s jiným POO^\bullet nebo reakcí s H^+ .

Proteinové peroxidy můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří POOH, u nichž je peroxidová skupina navázána na α -uhlíku. Tyto peroxidace jsou vyvolány ROS a nejnadhěji jim podléhají aminokyseliny Pro, Lys, Glu, Val, Ile a Leu. Proteinové

α -hydroperoxydy tvoří asi 90 % všech vzniklých POOH. Jejich vznik je znázorněn ve schématech 6 a 7 [62].

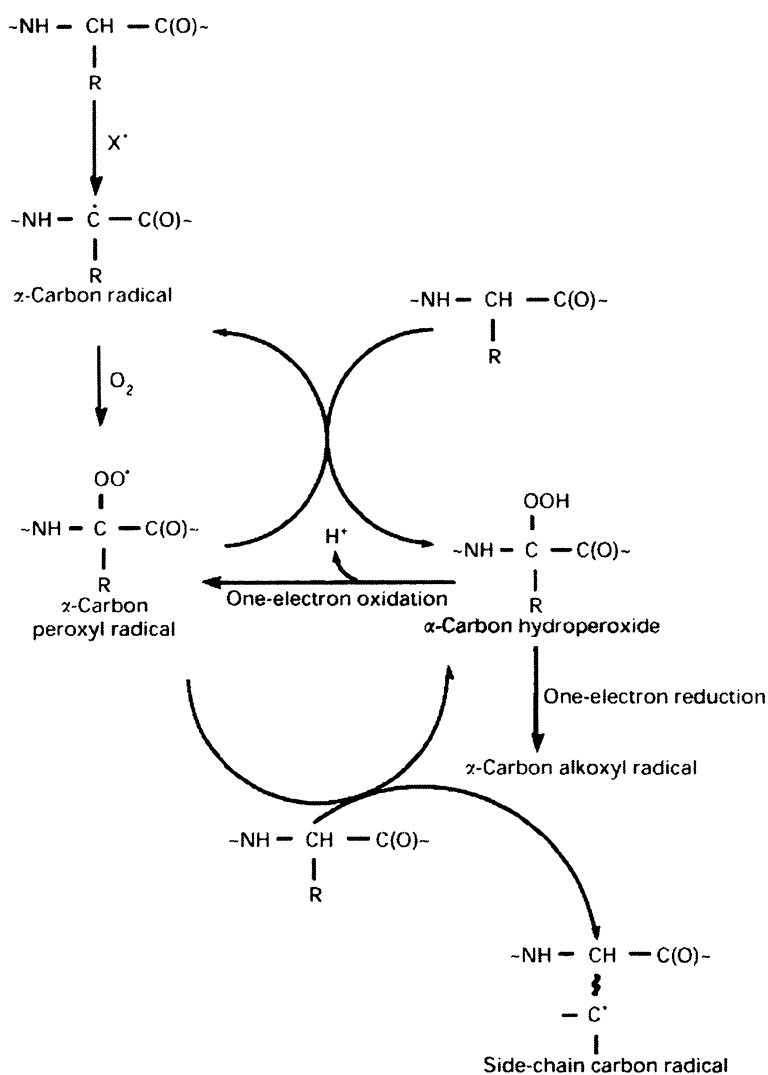
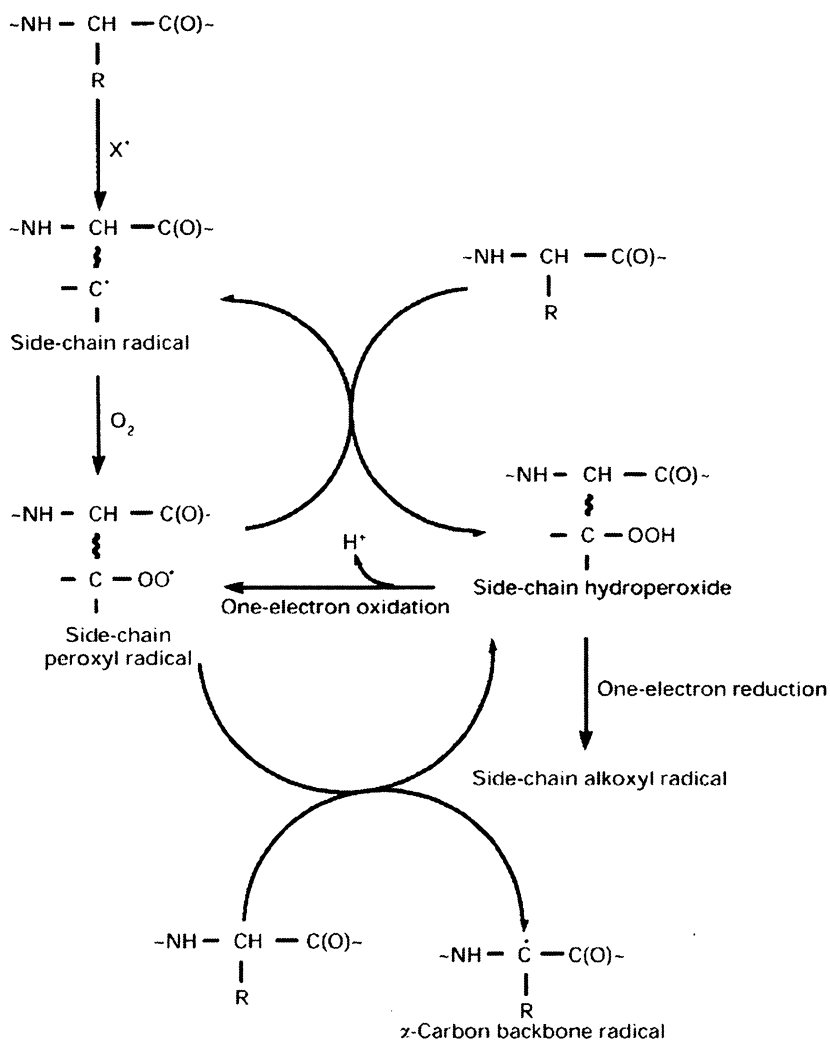


Schéma 6: Vznik proteinových α -hydroperoxidů

$-NH-\underset{\substack{| \\ R}}{CH}-C(O)-$ = schematické znázornění aminokyseliny vázané v peptidické vazbě proteinu

α -Carbon radical = α -uhlíkový radikál – radikál na uhlíku vedle funkční skupiny;
 α -Carbon peroxy radical = α -uhlíkový peroxidový radikál – peroxidový radikál navázaný na uhlíku vedle funkční skupiny;
 One-electron oxidation = oxidace jedním elektronem;
 α -Carbon hydroperoxide = α -uhlíkový hydroperoxid – peroxidová skupina navázaná na uhlíku vedle funkční skupiny;
 One-electron reduction = redukce jedním elektronem;
 Side-chain carbon radical = uhlíkový radikál na postranním řetězci.

Do druhé skupiny patří proteinové hydroperoxydy, které mají peroxidovou skupinu navázanou na jiném uhlíku než α . Tvoří asi 10 % všech POOH a vznikají při reakci s O_2 a ROS.



Schema 7: Vznik proteinových hydroperoxidů, které nemají peroxidovou skupinu vázanou na α uhlíku

-NH-CH(R)-C(O)- = schematické znázornění aminokyseliny vázané v peptidické vazbě proteinu

Side-chain radical = radikál na uhlíku, který se nenachází přímo vedle funkční skupiny, radikál na jiném než α -uhlíku, *Side-chain peroxy radical* = peroxidový radikál – peroxidový radikál navázaný na jiném než α -uhlíku, *One-electron oxidation* = oxidace jedním elektronem, *Side-chain hydroperoxide* = hydroperoxid, jehož peroxidová skupina je navázaná na jiném uhlíku než α -uhlíku, *One-electron reduction* = redukce jedním elektronem, *Side-chain alkoxy radical* = uhlíkový radikál na postranním řetězci, *α -Carbon backbone radical* = α -uhlíkový radikál – radikál na uhlíku vedle funkční skupiny.

Proteiny jsou častými terči volných radikálů; jejich poškození je často spojeno s pozměněnou funkcí iontových pump. Nejčastěji se toto poškození týká Na^+/H^+ a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporterů, které bývají inaktivovány redukcí -SH skupin. Změna koncentrace buněčného kalcia má vliv na intracelulární proteolysu. Vápenaté ionty se v cytosolu hromadí, dochází k aktivaci proteas a fosfolipas a ke změnám membránového potenciálu [8]. Do dvou hodin může dojít k buněčné smrti. Oxidace iontových transporterů byly studovány ve vztahu k ischemii, srdeční arytmií, Alzheimerově chorobě a diabetu mellitu [16, 38, 63].

4. 4. 2. 1 Stanovení proteinových hydroperoxidů

Pro stanovení celkového množství POOH bylo v porovnání s lipidovými hydroperoxy vyvinuto výrazně méně metod, které mají ve většině případů spektrofotometrickou detekci. Prvním krokem je odstranění lipidové složky, a následující stanovení je modifikací metod původně vyvinutých pro stanovení produktů lipidových hydroperoxidací.

Stanovení proteinových hydroperoxidů reakcí Fe^{2+} s xylenolovou oranží

Pomocí této reakce, kdy reagují železité ionty a xylenolová oranž, můžeme měřit proteinové hydroperoxy v krevním séru a to až po odstranění lipidové složky séra. Na tomto principu je založena např. metoda G-PCA-FOX (guanidine–perchloric acid–ferric–xylenol orange) pro měření proteinových hydroperoxidů. Proteinové hydroperoxy oxidují přidávané železnaté ionty na železité, které následně reagují s xylenolovou oranží [31].



Koncentraci komplexu Fe-XO stanovíme spektrofotometricky při 560 nm a z ní výpočtem koncentraci proteinových hydroperoxidů [40].

Měření proteinových hydroperoxidů systémem Cu^{2+} /neocuproin

Tato metoda je založena na redukcí Cu^{2+} proteinovými hydroperoxy na Cu^+ . Mědné ionty tvoří barevný komplex s neocuproinem (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin) – jehož absorpenci můžeme měřit při 450 nm [64].

4.5 Konjugované dieny

Jedním z dalších velmi častých cílových molekul RONS jsou vícenenasycené mastné kyseliny (PUFA, Polyunsaturated Fatty Acids), které jsou součástí membránových fosfolipidů. Pod vlivem RONS dochází k lipoperoxidaci molekul PUFA. Lipoperoxidace je sled chemických reakcí, při kterých RONS odebírají H^+ z molekuly PUFA, dochází ke změně pentadienového uspořádání dvojných vazeb a vzniku konjugovaných dienů. Většina konjugovaných dienů tvořících se v organismu vzniká lipoperoxidací kyseliny linolové nebo jejích esterů.

Konjugované dieny velmi snadno reagují s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (LOO^{\cdot}), který atakuje další řetězce PUFA, odebírá jim H^+ a tím dochází ke vzniku dalších lipidových hydroperoxidů. Lipoperoxidací kyseliny linolové nebo jejích esterů vznikají hydroperoxydy s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Jejich hydrolyzou vznikají toxické aldehydy jako např. MDA a 4-HNE, alkoxyradikály a nízkomolekulární těkavé uhlovodíky (pentan, hexan).

Toxické aldehydy MDA a 4-HNE reagují se skupinami $-SH$ a $-NH_2$ bílkovin, vznikají intramolekulární a intermolekulární vazby a dochází k tzv. zesíťování bílkovin, mění se jejich chemická struktura i funkce.

4.5.1 Stanovení konjugovaných dienů

Konjugované dieny (CD) jsou jedním z produktů lipidových peroxidací nenasycených mastných kyselin [65]. Konjugované dieny stanovujeme v mikrosomech nebo LDL v přítomnosti EDTA [58, 66].

Metoda pro stanovení CD v LDL je založena na jejich precipitaci ze séra pomocí heparin – citrátového pufru. Precipitované LDL rozpustíme ve fyziologickém roztoku a lipidy extrahujeme směsí chloroform:methanol (2/1 v/v), inkubujeme 10 minut za občasného míchání při laboratorní teplotě. Poté přidáme destilovanou vodou a promyjeme. Spodní organickou vrstvu vysušíme pod proudem dusíku. Odparek rozpustíme v cyklohexanu a koncentraci CD stanovíme spektrofotometricky při 234 nm [67,68].

5. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

1. Zavést metody stanovení lipidových hydroperoxidů (metoda M-PCA-FOX) a proteinových hydroperoxidů (metoda G-PCA-FOX) do laboratorní praxe lipidové laboratoře IV. Interní kliniky 1. lékařské fakulty a VFN.
2. V rámci klinické studie zaměřené na sledování oxidačního stresu u kriticky nemocných v septickém stavu stanovit koncentrace lipidových a proteinových hydroperoxidů a konjugovaných dienů v séru septických pacientů a u dvou kontrolních skupin pacientů bez známek sepse.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Parametry klinické studie

Pro klinickou studii byly odebírány krevní vzorky 3 skupin sledovaných osob. První skupina sestává z pacientů, kteří byli hospitalizováni na jednotce intenzivní péče a koronární jednotce IV. interní kliniky 1. LF UK a byla u nich diagnostikována sepse. Druhá skupina je tvořena kriticky nemocnými pacienty, kteří byli taktéž hospitalisováni na JIP nebo koronární jednotce IV. Interní kliniky 1. LF UK a nebyl u nich diagnostikován septický stav. Poslední sledovanou skupinou jsou ambulantní kontroly.

6.1.1. Kriteria výběru pacientů

Skupina 1: septičtí pacienti:

Pacienti, kteří byli hospitalisováni na JIP nebo koronární jednotce IV. Interní kliniky 1. LF UK VFN, u nichž byla diagnostikována sepse. Tito pacienti byli vybíráni na základě každodenního screeningu všech pacientů.

1) vstupní kriteria:

- a) příznaky spojené s definicí sepse [5, 6].
 - teplota vyšší než 38 °C nebo nižší než 36 °C
 - srdeční frekvence > 90 tepů/min
 - dechová frekvence > 20 dechů /min nebo parciální tlak CO₂ < 32 mm Hg
 - počet bílých krvinek > 12 000 buněk/mm³ nebo > 10 % nezralých buněk.
- b) přítomnost infekce (lokalizovaná infekce, event. pozitivní hemokultura)
definovaná CDC (Centres for Disease Control).
- c) APACHE II skóre (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) vyšší než 10.

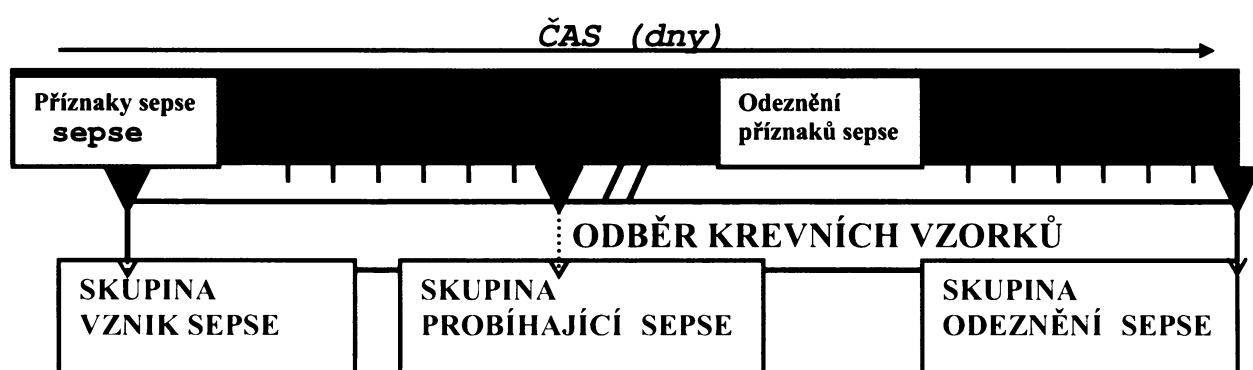
2) vylučovací kriteria:

- a) zavedená terapie antioxidanty (farmakologické dávky vitamínu C, vitamínu E, alopurinolu, N-acetylcysteinu)
- b) diabetes mellitus
- c) generalisované tumory
- d) imunosuprese, chemoterapie
- e) chronická dialýza

U přijatých septických pacientů byla v průběhu prvních 48 hodin hospitalisace sledována koncentrace CRP v séru a pokud nedošlo v tomto časovém intervalu k jejímu významnému zvýšení ($\Delta = 60$ mg/l), byla daná osoba ze studie vyloučena.

Časový plán odběru krve u kriticky nemocných pacientů v sepsi

První odběr krevního vzorku byl proveden poté, co byla u pacienta diagnostikována sepse. Druhý odběr byl proveden po 7 dnech od dne, kdy byla sepse diagnostikována. Třetí odběr byl proveden po odeznění příznaků sepse viz schema 8:



Schema 8: Časový plán odběru krve u kriticky nemocných pacientů v sepsi

Tabulka 5: Charakteristika kriticky nemocných pacientů v sepsi

PACIENT	POHLAVÍ	VĚK	APACHE II SKORE	CRP (mg/l)	ZDROJ INFEKCE
S001	M	79	12	28	kanylová sepse
S002	M	37	11	347	pankreatitida
S003	F	83	16	62	plíce
S004	M	61	20	86,3	plíce
S005	M	79	14	134	plíce
S006	F	84	28	133	plíce,urosepse
S007	M	61	15	105	kanylová sepse
S008	F	74	28	461	urosepse
S009	F	54	12	30,2	tenké střevo
S010	M	66	14	185,5	plíce
S011	F	64	23	332	plíce
S012	M	76	18	149	plíce
S013	M	41	22	316	pankreatitida

S 001-013 - septičtí pacienti v pořadí podle přijetí do studie, APACHE II skore - Acute Physiologic And Chronic Health Evaluation, CRP - C-reaktivní protein (mg/l séra), zdroj infekce - místo primární infekce

Skupina 2: Kriticky nemocni pacienti bez příznaků sepsi:

1) *Vstupní kritéria:* odpovídající hodnoty APACHE II skóre, pohlaví a věku (± 5 let) vzhledem ke skupině kriticky nemocných pacientů v sepsi

2) *Vylučovací kritéria:* a) příznaky sepsi dané definicí

b) přítomnost infekce (lokalizovaná infekce, event. pozitivní hemokultura) definovaná CDC kritérii

c) přítomnost některého z vylučovacích kritérií skupiny pacientů s diagnosou sepsi

Tabulka 6: Charakteristika skupiny neseptických kontrol

PACIENT	POHLAVÍ	VĚK	APACHE II SKORE	CRP (mg/l)	PÁROVÁ SEPTICKÁ OSOBA
NK001	M	84	14	4,8	S 001
NK002	M	37	13	8	S 002
NK003	F	81	17	< 2	S 003
NK009	F	54	13	43	S 009
NK010	M	66	17	17,4	S 010

NK 001-010 - neseptické kontroly ke skupině kriticky nemocných pacientů, APACHE II skóre - Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation, CRP - C-reaktivní protein (mg/l séra)

Skupina 5: Ambulantní kontroly:

1) *vstupní kritéria:* a) stejné pohlaví jako septický pacient

b) shodný věk ± 5 let

2) *Vylučovací kritéria:* a) zavedená terapie antioxidanty (farmakologické dávky

vitaminu C, vitaminu E, allopurinolu, N-acetylcysteinu)

b) chronická dialýza

c) diabetes mellitus

d) generalisované tumory

e) imunosuprese, chemoterapie

Tabulka 7: Charakteristika skupiny ambulantních kontrol

PACIENT	POHLAVÍ	VĚK	CRP (mg/l)	PÁROVÁ SEPTICKÁ OSOBA
AK001	M	80	10,1	S 001
AK002	M	34	8,1	S 002
AK003	F	78	3,2	S 003
AK004	M	60	< 2,0	S 004
AK005	M	80	5,8	S 005
AK006	F	80	3,8	S 006
AK007	M	59	2,1	S 007
AK008	F	77	< 2,0	S 008
AK009	F	56	< 2,0	S 009
AK010	M	68	< 2,0	S 010
AK011	F	69	2,2	S 011
AK012	M	78	11,0	S 012
AK013	M	36	< 2,0	S 013

AK 001-013 - ambulantní kontroly, CRP - C-reaktivní protein (mg/l séra)

Do klinické studie, která byla započata dne 1. října 2005, bylo celkem zařazeno 13 pacientů s klinickými příznaky sepse, z toho 8 mužů a 5 žen ve věkovém rozmezí 37 – 84 let, kteří byli hospitalisováni na JIP a koronární jednotce IV. Interní kliniky 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Druhý odběr byl proveden celkem u 11 pacientů, z toho bylo 7 mužů a 4 ženy ve věkovém rozmezí 37 – 83 let, 2 pacienti zemřeli.

Třetí odběr byl proveden pouze u 9 pacientů, z toho bylo 5 mužů a 4 ženy ve věkovém rozmezí 41 – 83 let, 2 pacienti zemřeli.

Do druhé skupiny byli zařazeni celkem 3 kriticky nemocní muži a 2 ženy hospitalisovaní na JIP, u kterých nebyly diagnostikovány příznaky sepse. Do této skupiny byli vybíráni pacienti vždy s ohledem na pohlaví a stáří septického pacienta.

Poslední třetí skupina je tvořena ambulantními kontrolami odpovídajícího věku a pohlaví vůči septickým pacientům.

Po stanovení diagnostických parametrů pro klinickou studii byl pacientům v sepsi odebrán krevní vzorek na zpracování séra (srážlivá krev), plasmy a krevních buněk. V průběhu studie byly k septickým pacientům hledány vhodné ambulantní a neseptické kontroly.

6. 2 Materiál a metody

6. 2. 1 Použité chemikálie a přístroje

1. Použité chemikálie pro stanovení lipidových hydroperoxidů

chloroform s 4 mM BHT: (chloroform: Penta, ČR, BHT: Sigma USA)

navážka: 0,0882 g BHT rozpuštěno ve 100 ml chloroformu

uskladnění: uzavíratelná skleněná tmavá nádoba se zábrusem
na 250 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C

methanol s 4 mM BHT: (methanol: Chromservis, ČR, BHT: Sigma USA)

navážka: 0,0882 g BHT rozpuštěno ve 100 ml methanolu

uskladnění: uzavíratelná skleněná tmavá nádoba se zábrusem
na 250 ml 4mM BHT

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C

kyselina chloristá – 110 mM: (Penta, ČR)

4,726 ml 70% kyseliny chloristé rozpuštěno v 500 ml
destilované vody

uskladnění: uzavíratelná skleněná světlá nádoba se zábrusem
na 500 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C, možno i déle

kyselina chloristá - 2,093 M: (Penta, ČR)

17, 99 ml 70% kyseliny chloristé rozpuštěno ve 100 ml
destilované vody

uskladnění: uzavíratelná skleněná nádoba se zábrusem
na 250 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C (v lednici možno i
déle)

Xylenolová oranž – XO 5mM: (Sigma, USA)

navážka: 0,019 g XO rozpuštěno v 20 ml destilované
vody

uskladnění: uzavíratelná skleněná nádoba na 20 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C

Síran železnato –amonný – 5mM: $NH_4FeSO_4 \cdot 12 H_2O$ (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Národní podnik Praha, ČR)

navážka: 0,098 g síranu železnato–amonného rozpuštěno v 50 ml destilované vody

uskladnění: uzavíratelná skleněná nádoba

skladovatelnost: 1h v uzavřené nádobě při 8 °C

Trifenylfosfin – TPP – 10M: (Sigma USA)

navážka: 0,0053 g TPP rozpuštěno ve 20 ml chloroformu

uskladnění: uzavíratelná skleněná světlá nádoba se zábrusem na 20 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C

2. Použité chemikálie pro stanovení proteinových hydroperoxidů:

Kyselina chloristá 0,5M: 4,76 ml 70% kyseliny chloristé doplnit do 50 ml destilovanou vodou

uskladnění: uzavíratelná skleněná nádoba se zábrusem na 100 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C, možno i déle

Kyselina chloristá 0,2M: 3,81 ml 70% kyseliny chloristé doplnit do 100 ml destilovanou vodou

uskladnění: uzavíratelná skleněná nádoba se zábrusem na 100 ml

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C, možno i déle

Guanidin hydrochlorid 6M: (Sigma USA)

navážka: 28,66 g rozpuštěno v 50 ml destilované vody

uskladnění: uzavíratelná tmavá nádoba na 100 ml se zábrusem

skladovatelnost: 1 měsíc při 8 °C

Dithioničitan sodný 0,01M: (Sigma USA)

navážka: 0,87 g rozpuštěno v 50 ml destilované v

uskladnění: uzavíratelná tmavá nádoba se zábrusem

skladovatelnost: 3 měsíce při 8 °C

Xylenolová oranž - XO 5mM, chloroform s 4 mM BHT, síran železnato –amonný – 5mM

3. Použité chemikálie pro stanovení konjugovaných dienů:

Fysiologický roztok: NaCl

navážka: 9 g NaCl rozpustíme v 1 litru destilované vody

uskladnění: uzavíratelná nádoba z čírého skla

skladovatelnost: 3 týdny při 8 °C

Pufr citrát – heparin (pH 5,05): citrát sodný (Sigma, USA)

heparin (Zentiva a.s., ČR)

navážka: 3,678 g citrátu sodného rozpustíme v 196 ml destilované vody, přidáme 2 ml heparinu a pomocí kyseliny chlorovodíkové upravíme pH 5,05

uskladnění: uzavíratelná nádoba z čírého skla

skladovatelnost: 3 týdny při 8 °C

Cyklohexan (Chromservis s.r.o., ČR)

4. Přístroje pro měření:

Spektrofotometr: Ultrospec III (Pharmacia LKB Biotechnology, Švédsko)

pH metr: PHM 62 standard pH meter (Radiometr Kopenhagen, Dánsko)

Váhy: digitální analytické váhy MC1 Analytic AC 120 S (Sartorius, Německo)

Centrifugy: typ MPW-341 a MPW-310 (Mechanika Precyzyjna, Polsko)

typ K23D (Janetzki, Jena, Německo)

Úprava destilované vody: reversní osmosa MILLI-RO60 water purification system
(Millipore, USA)

Třepačka: Micro-Shaker type 326 m (Premed, Polsko)

Kyvety: LABO-MS, spol. s r.o. (ČR)

6. 2. 2 Preanalytické zpracování vzorků

1. Příprava plasmy:

Po odebrání krve do vacutainerů s antikoagulačním činidlem K₂EDTA vzorek transportujeme v ledové lázni. Krevní buňky oddělíme od plasmy do 2 h po odběru centrifugací v předem vychlazené centrifuze na 4 °C při 3500 rpm po dobu 7 minut. Plasmu rozpipetujeme do zkumavek podle Eppendorfa a skladujeme při teplotě -80 °C.

2. Isolace erytrocytů

Po oddělení plasmy od červených krvinek tyto buňky opatrně promyjeme 3x

vychlazeným fyziologickým roztokem v poměru 1:15, centrifugujeme 7 min při 3500 rpm. Po centrifugaci odstraníme supernatant, promyté červené krvinky rozpíjetujeme do zkumavek podle Eppendorfa a skladujeme při -80 °C.

3. Příprava séra:

Po odebrání krevního vzorku do vacutainerů bez antikoagulačního činidla, necháme krev 30 minut stát při laboratorní teplotě, čímž docílíme úplné koagulace krve. Poté sérum separujeme v předem vychlazené centrifuze na teplotu 4 °C po dobu 7 min. při 3500 rpm. Sérum oddělíme od krevních buněk a rozpíjetujeme do zkumavek podle Eppendorfa po 650 µl a 450 µl a zamrazíme do 1 h po odebrání vzorku. Sérum pro stanovení proteinových a lipidových hydroperoxidů skladujeme při -80 °C po dobu 14 dnů.

Tabulka 8: zpracování krevního vzorku pro přípravu séra

UCHOVÁVÁNÍ PO ODBĚRU	CENTRIFUGACE	MATERIÁL	BARVA/ POČET ALIKVOTŮ	ALIKVOT (µl)	SKLADOVÁNÍ	ANALYT
30 min stání 25 °C	7 min, 3500 rpm, 25 °C	sérum	bezbarvá/2	150	-80 °C	nitrity/nitráty
			modrá/2	250 + 25 10% EDTA	-20 °C	CD
			bezbarvá/2	300	-80 °C	PON
			žlutá/2	250	-80 °C	VR
			zelená/2	650	-80 °C	POOH
			zelená/2	650		LOOH

Tabulka 9: Zpracování krevního vzorku pro přípravu plazmy a erytrocytů

UCHOVÁVÁNÍ PO ODBĚRU	CENTRIFUGACE	MAT.	BARVA/POČET ALIKVOTŮ	ALIKVOT (μl)	SKLADOVÁNÍ	ANALYT
Odběr na led a okamžitá centrifugace	7 min, 3500 rpm, 4 °C	Plasma	bezbarvá/2	100	-80 °C	Nitrotyrosin
			modrá/1	1000	-20 °C	Profil MK
			zelená/2	500	-80 °C	Fosfolipidy
			Žlutá/3	200	kapalný dusík	Homocystein
		RBC	bezbarvá/2	100	+8 °C	GR
			bezbarvá/2	250		GPX
			bezbarvá/2	250		CAT
			bezbarvá/2	350		SOD
			bezbarvá/2	500 + 100 6% CH ₃ COOH + 400 sulfosalicyl. k.		GSH/GSSG
			zelená/2	500		-80 °C

6. 2. 3 Princip stanovení lipidových a proteinových hydroperoxidů

Stanovení lipidových hydroperoxidů metodou M-PCA-FOX a proteinových hydroperoxidů metodou G-PCA-FOX je založeno na jejich reakci s Fe²⁺ a následném spektrofotometrickém stanovení koncentrace Fe³⁺ ve formě komplexu s xylenolovou oranž. Xylenolová oranž je do reakčního roztoku přidána v nadbytku. Stechiometrie této reakce za daného experimentálního uspořádání je v poměru 1 : 1 [31]. Oxidace Fe²⁺ na Fe³⁺ ve slepé zkoušce, která je individuální pro každý vzorek, je potlačena v případě lipidových hydroperoxidů přidáním definovaného množství trifenylofosfinu (TPP) v chloroformu, v případě proteinových hydroperoxidů pomocí dithioničitanu sodného. Trifenylofosfin a dithioničitan sodný redukuje peroxidové skupiny lipidů a proteinů. Ze změny absorbance vypočteme pomocí molárního extinkčního koeficientu koncentraci proteinových i lipidových hydroperoxidů.



6. 2. 3. 1 Stanovení koncentrace lipidových hydroperoxidů metodou M-PCA-FOX

Lipidové hydroperoxy stanovujeme v séru, které bylo zamraženo do 2 hodin po odebrání krevního vzorku a skladováno při teplotě -80°C nejdéle 14 dní. Množství lipidových hydroperoxidů stanovujeme spektrofotometricky při 560 nm.

1. Extrakce lipidů:

Do zkumavky podle Eppendorfa (2,5 ml) odpipetujeme 200 μl séra, přidáme 900 μl extrakční směsi (CHCl_3 a CH_3OH 2:1 s 4mM BHT) a třepeme 5 min. Po dalších 5 min stání centrifugujeme při 11500 rpm po dobu 6 min. Po centrifugaci odebereme 500 μl spodní chloroformové vrstvy, přeneseme do další zkumavky a vysušíme proudem N_2 při 40°C .

2. Stanovení lipidových hydroperoxidů:

K vysušenému extraktu přidáme reagentie podle rozpisu v tab.10.

Tabulka 10: Reagentie pro stanovení lipidových hydroperoxidů

REAKČNÍ ROZTOKY	VZOREK	BLANK
Chloroform s 4mM BHT	250 μl	250 μl
Metanol s 4mM BHT	460 μl	460 μl
Kyselina chloristá 2,093M	41 μl	41 μl
Xylenolová oranž 5mM	30 μl	30 μl
Fe^{2+} 5mM	20 μl	20 μl
Trifenylfosfin 0,1M	0 μl (přidáme 20 μl CHCl_3)	20 μl

Po přidání příslušných roztoků necháme inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě a pak změříme změnu absorbance při 560 nm.

3. Výpočet koncentrace lipidových hydroperoxidů

Výpočet koncentrace provedeme pomocí Lambertova – Beerova zákona s využitím publikovaného molárního extinkčního koeficientu $\epsilon = 51200 \text{ [dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})]$ [31].

6. 2. 3. 2 Stanovení koncentrace proteinových hydroperoxidů metodou G-PCA-FOX

Proteinové hydroperoxy stanovujeme v séru za stejných podmínek jako lipidové hydroperoxy spektrofotometricky při 560 nm.

1. Extrakce proteinů:

Do zkumavky podle Eppendorfa odpipetujeme 100 μl séra, proteiny srazíme 500 μl 0,2M HClO_4 a 10 min necháme stát v ledové lázni. Poté centrifugujeme při 11500 rpm po dobu 6 min. Odstraníme supernatant, proteinovou složku rozpustíme v 1100 μl 6M GuHCl , přidáme 1100 μl CHCl_3 s 4mM BHT, protřepeme a odebereme 850 μl horní vodné fáze. K 850 μl vodné fáze přidáme 850 μl CHCl_3 s 4mM BHT, protřepeme a odebereme 700 μl vodné fáze, která je zbavena možných lipidových komponent. Při odebírání horní vodné fáze musíme dbát zvláštní opatrnosti, neboť i nepatrné množství organické fáze může znehodnotit celý vzorek.

2. Stanovení proteinových hydroperoxidů:

K proteinovému extraktu v 6M GuHCl (700 μl) přidáme reagentie podle rozpisu v tab. 11.

Tabulka 11: Reagentie pro stanovení proteinových hydroperoxidů

REAKČNÍ ROZTOKY	VZOREK	BLANK
Kyselina chloristá 0,5M	40 μl	40 μl
Xylenolová oranž 5mM	25 μl	25 μl
Destilovaná voda	25 μl	25 μl
Fe^{2+} 5mM	10 μl	10 μl
Dithioničitan sodný 1mM	0 μl (20 μl destil. vody)	20 μl

Po přidání příslušných roztoků zamícháme a necháme inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě a změříme změnu absorbance při 560 nm.

3. Výpočet koncentrace proteinových hydroperoxidů

Výpočet koncentrace provedeme pomocí Lambertova – Beerova zákona s využitím publikovaného molárního extinkčního koeficientu $\epsilon = 35900 \text{ [dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})]$ [31].

6. 2. 4 Stanovení konjugovaných dienu

Konjugované dieny stanovujeme v séru, do kterého bylo přidáno 10 % objemu 10% Na₂EDTA. Sérum skladujeme zamražené při teplotě -20 °C po dobu tří týdnů. Celkovou koncentraci konjugovaných dienu stanovíme spektrofotometricky při 234 nm.

1. Příprava precipitačního pufru:

V 196 ml destilované vody rozpustíme 3,764 g citrátu sodného (Na₃C₆H₅O₇), přidáme 2 ml heparinu (5000 UI/ml) a pomocí kyseliny chlorovodíkové upravíme pH na 5,05.

2. Precipitace

Do skleněných zkumavek odpipetujeme 110 µl séra s Na₂EDTA, přidáme 1 ml precipitačního pufru a dobře zamícháme. Po desetiminutové inkubaci v temnu při laboratorní teplotě centrifugujeme 10 minut při 2800 rpm. Odebereme supernatant a okamžitě přidáme 100 µl fyziologického roztoku, ve kterém rozmícháme vzniklou sraženinu. Přidáme 1500 ml extrakční směsi (CHCl₃ a CH₃OH 2:1 s 4mM BHT) a důkladně promícháme. Necháme stát 10 minut při laboratorní teplotě za občasného promíchání. Po 10 minutách přidáme 250 ml destilované vody, zamícháme a centrifugujeme 5 min při 2800 rpm. Poté odebereme 800 µl spodní organické vrstvy a vysušíme proudem N₂ při 40 °C.

3. Měření:

K odparku přidáme 300 µl cyklohexanu, promícháme a během nejkratšího možného časového intervalu proměříme změnu absorbance vzorku při 234 nm proti čistému cyklohexanu.

4. Výpočet koncentrace konjugovaných dienu

Výpočet koncentrace provedeme pomocí molárního extinkčního koeficientu

$\epsilon = 29500 \text{ [dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm})]$ podle vzorce:

$$c = A \times 300 / 2,95 \times 1,375 \text{ [}\mu\text{mol/l]}$$

Číselné koeficienty (300, 2.95, 1.375) zohledňují ředění, ϵ a přepočtení objemu.

6. 2. 5. Stanovení klinicko-biochemických parametrů vzorků

Stanovení klinicko-biochemických parametrů vzorků bylo provedeno Centrální laboratoří Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky I.LF UK a VFN.

Stanovení C-reaktivního proteinu

Kvantitativní stanovení CRP v séru se provádí imunoturbidimetrickou metodou pomocí komerčně dostupného kitu K-ASSAY CRP (Kamiya Biomedical Company, USA) na automatickém analysátoru Hitachi Modular (Japonsko). Reakcí specifické kozí protilátky proti lidskému CRP vzniká s tímto proteinem precipitát imunokomplexu. Na částicích precipitátu dochází k rozptylu světla. Množství CRP je přímo úměrné stupni turbidity v kyvetě, který se měří jako nárůst optické hustoty při 340 nm a 700 nm. Referenční rozmezí: 0,0 - 7,1 mg/l, vyšší koncentrace ukazuje na přítomnost infekce nebo zánětu [20].

Stanovení koncentrace celkového, HDL a LDL cholesterolu

Koncentrace celkového cholesterolu v séru se stanovuje enzymatickou metodou pomocí soupravy BIO-LA-TEST CHOLESTEROL 2500 (Pliva-Lachema, ČR) na automatickém analysátoru Cobas Mira (Roche, Švýcarsko) při 500 nm.

Koncentrace HDL-cholesterolu se stanovuje v supernatantu po selektivní precipitaci lipoproteinu LDL srážecím roztokem (kyselina fosfowolframová, chlorid hořečnatý) ze soupravy BIO-LA-TEST HDL-CHOLESTEROL (Pliva-Lachema, ČR) stanovuje stejnou enzymatickou metodou jako koncentrace celkového cholesterolu.

Fysiologické rozmezí koncentrace celkového cholesterolu v séru je u osob od 15 do 40 let 3,10 – 5,20 mmol/l a u osob nad 40 let 3,83 – 5,80 mmol/l. Fysiologická koncentrace HDL cholesterolu v séru je u mužů 1,10 – 1,40 mmol/l, u žen 1,30 – 1,60 mmol/l [20].

6. 2. 6 Statistické zpracování výsledků

Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno pomocí těchto statistických programů: SigmaStat verze 3.1 (SysStat Software Inc. CA, U.S.A.), MiniTab (MiniTab Inc. PA, U.S.A.) a GraphPrism (GraphPad Software, CA, U.S.A.). Statistická významnost získaných výsledků byla určena Studentovým-Newmanovým-Keulsovým testem (t-test) v programu SigmaStat. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na hladině $p < 0,05$. Korelace (Pearsonův koeficient) mezi stanovanými parametry byly prováděny v programu MiniTab. Konečná grafická prezentace výsledků vznikla s pomocí programů MiniTab a Microsoft Excel.

7 VÝSLEDKY

Metody M-PCA-FOX a G-PCA-FOX byly vypracovány podle práce Gaye a Gebickiho [31]. Při zavádění metody bylo zjištěno, že výsledky může ovlivnit řada faktorů, a proto bylo nutné metodu optimalisovat.

7.1 Optimalisace podmínek pro stanovení lipidových hydroperoxidů metodou M-PCA-FOX

Vliv teploty a skladování materiálu

Při stanovení stability lipidových hydroperoxidů v krevním séru jsme se zaměřili na změny jejich koncentrací v závislosti na teplotě skladování (při 4 °C, -20 °C a -80 °C) a na délce skladování (po dobu 1 až 35 dní).

Tabulka 12: Vliv teploty a délky skladování na koncentraci LOOH

Doba uskladnění (dny)	Teplota uskladnění		
	4 °C	-20 °C	-80 °C
	Koncentrace LOOH [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]		
1	3,20 ± 0,02	3,22 ± 0,03	3,24 ± 0,02
2	1,72 ± 0,02	2,81 ± 0,01	3,15 ± 0,01
3	1,05 ± 0,03	2,72 ± 0,03	3,13 ± 0,01
4	0,83 ± 0,05	2,70 ± 0,02	3,13 ± 0,02
5	0,75 ± 0,03	2,66 ± 0,03	3,15 ± 0,03
6	0,69 ± 0,01	2,60 ± 0,01	3,13 ± 0,01
7	0,66 ± 0,05	2,51 ± 0,02	3,13 ± 0,01
14	0,48 ± 0,02	1,59 ± 0,02	3,12 ± 0,03
21	0,42 ± 0,01	0,75 ± 0,04	2,93 ± 0,02
28	0,39 ± 0,04	0,54 ± 0,02	2,06 ± 0,06
35	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,05	2,10 ± 0,04

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 naměřených hodnot ± SEM

Při měření stability LOOH se ukázalo, že nejvhodnější podmínky pro skladování materiálu jsou teplota -80 °C a doba maximálně 14 dní. Při teplotě -20 °C došlo k poklesu koncentrace LOOH již po jednom dni o 12,7 %, po 14 dnech pak o 50,5 %. Při teplotě 4 °C došlo k poklesu koncentrace o 46,2 % již po jednom dni.

Vliv rozpouštědla pro trifenyfosfin na absorbanci blanku a vzorku LOOH

Trifenyfosfin se v polárních rozpouštědlech prakticky nerozpouští. Trifenyfosfin hraje důležitou roli v blankovém vzorku, brání oxidaci železnatých iontů na železité, které by se

následně vázaly na xylenolovou oranž a tvořily tak barevný komplex. Naším cílem bylo snížit absorbanci blankového roztoku na minimum a to použitím různých organických rozpouštědel:

Tabulka 13: Vliv rozpouštědla pro trifenyfosfin na absorbanci blanku a vzorku lipidových hydroperoxidů

Rozpouštědlo	$A_{(560)} \text{ blanku} - A_{(560)} \text{ vody}$	$A_{(560)} \text{ vzorku} - A_{(560)} \text{ blanku}$
methanol	$0,300 \pm 0,01$	$0,055 \pm 0,01$
ethanol	$0,266 \pm 0,01$	$0,094 \pm 0,02$
chloroform	$0,220 \pm 0,02$	$0,139 \pm 0,02$
diethylether	$0,260 \pm 0,01$	$0,100 \pm 0,01$
heptan	$0,226 \pm 0,01$	$0,119 \pm 0,01$
cyklohexan	$0,240 \pm 0,02$	$0,104 \pm 0,02$
dichlormethan	$0,250 \pm 0,01$	$0,111 \pm 0,01$
aceton	$0,236 \pm 0,01$	$0,125 \pm 0,02$
n-hexan 95 ⁺	$0,266 \pm 0,01$	$0,091 \pm 0,10$
propanol	$0,242 \pm 0,02$	$0,117 \pm 0,01$

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 naměřených hodnot \pm SEM

Z tabulky 13 vyplývá, že nejvhodnějším organickým rozpouštědlem pro přípravu roztoku TPP, který v blankovém roztoku brání oxidaci železnatých iontů na železité, je chloroform. Po přidání tohoto roztoku do blankového vzorku je absorbance nejnižší. Nejméně vhodným rozpouštědlem pro TPP je methanol.

Vliv koncentrace trifenyfosfinu na absorbanci blanku a vzorku LOOH

Vliv koncentrace TPP byl sledován pro 0,001M; 0,01M; 0,1M; 0,5M roztoky TPP v chloroformu; výsledky ukazuje tab. 14.

Tabulka 14: Vliv koncentrace trifenyfosfinu na absorbanci blanku a vzorku lipidových hydroperoxidů

Koncentrace trifenyfosfinu v chloroformu [mol/dm ³]	$A_{(560)} \text{ blanku} - A_{(560)} \text{ vody}$	$A_{(560)} \text{ vzorku} - A_{(560)} \text{ blanku}$
0,001	$0,283 \pm 0,01$	$0,070 \pm 0,02$
0,01	$0,270 \pm 0,02$	$0,080 \pm 0,02$
0,1	$0,246 \pm 0,01$	$0,111 \pm 0,01$
0,5	$0,269 \pm 0,01$	$0,090 \pm 0,01$

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří naměřených hodnot \pm SEM

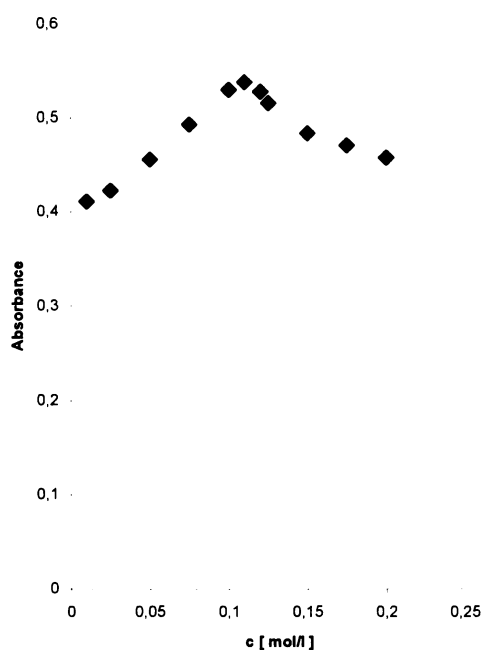
Z tabulky 14 vyplývá, že 0,1M TPP je pro stanovení koncentrace LOOH nejvhodnější. Absorbance blanků s nižším obsahem TPP jsou vyšší, čímž dochází ke snížení citlivosti metody. Absorbance blanku s 0,5M TPP v chloroformu je vyšší než blanku s 0,1M TPP,

což může být způsobeno žlutým zbarvením při vyšších koncentracích TPP.

Vliv koncentrace kyseliny chloristé na stanovení koncentrace LOOH

Pro dosažení co nejvyšší citlivosti metody jsme sledovali závislost absorbance na koncentraci kyseliny chloristé při konstantní koncentraci železitých iontů $12,44 \mu\text{M}$ a vlnové délce 560 nm [31]. Závislost je uvedena v grafu 1.

Graf 1: Absorbance komplexu Fe^{3+} -xylenolová oranž při různých koncentracích kyseliny chloristé.



Z grafu 1 je zřejmé, že nejvhodnější koncentrace kyseliny chloristé v prostředí, ve kterém stanovujeme koncentraci LOOH, je v soulase s literaturou 110 mM . Při nižší nebo vyšší koncentraci kyseliny chloristé dochází k poklesu absorbance. Hodnota pH reakčního prostředí má významný vliv na stanovení LOOH. Aby zůstal zachován objem vzorku, upravili jsme koncentraci zásobního roztoku kyseliny chloristé na $2,093\text{M}$ oproti literárnímu údaji, který doporučuje koncentraci 2M [31].

Vliv BHT v extrakční směsi na stanovení lipidových hydroperoxidů

V dostupné literatuře jsme našli různé názory na přidávání antioxidačního činidla BHT do methanolu a chloroformu. Někteří autoři tvrdí, že přídavek BHT do reakční směsi není

nutný, protože neovlivňuje množství naměřených hydroperoxidů [67]. Druhá část autorů naopak tvrdí, že přidání BHT do rozpouštědel je nezbytně nutné [31]. Tyto dva názory jsme se v naší studii pokusili ověřit.

Tabulka 15: Vliv BHT na celkové množství lipidových hydroperoxidů

	$A_{(560) \text{ blanku}} - A_{(560) \text{ vody}}$	$A_{(560) \text{ vzorku}} - A_{(560) \text{ blanku}}$
v přítomnosti BHT	0,245 ± 0,01	0,093 ± 0,02
bez přítomnosti BHT	0,268 ± 0,01	0,121 ± 0,01

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří naměřených hodnot ± SEM

Z předchozí tabulky je zřejmé, že antioxidační činidlo BHT má významný vliv na množství LOOH. V přítomnosti BHT jsme naměřili nižší absorbance blankového vzorku i nižší koncentraci LOOH. Z toho můžeme usoudit, že BHT chrání vzorek před možnou propagační radikálové reakce.

Stanovení reprodukovatelnosti metody M-PCA-FOX

Před zavedením metody M-PCA-FOX do laboratorní praxe jsme stanovili reprodukovatelnost dané metody. Zvolili jsme krevní vzorek septického pacienta a k němu věkem a pohlavím odpovídající krevní vzorek zdravé kontroly. U obou pacientů jsme stanovili množství LOOH 10x a určili směrodatnou odchylku našeho měření.

Tabulka 17: Reprodukovatelnost metody M-PCA-FOX

Zdravá kontrola			Septický pacient		
Vzorek	A	c [μmol/l]	Vzorek	A	c [μmol/l]
V1	0,056	1,09	V1	0,129	2,52
V2	0,061	1,19	V2	0,130	2,54
V3	0,051	0,99	V3	0,125	2,44
V4	0,060	1,17	V4	0,123	2,40
V5	0,550	1,07	V5	0,127	2,48
V6	0,056	1,09	V6	0,122	2,38
V7	0,059	1,15	V7	0,127	2,48
V8	0,060	1,17	V8	0,129	2,52
V9	0,053	1,04	V9	0,130	2,54
V10	0,049	0,96	V10	0,126	2,46
průměr		1,09	průměr		2,48
SD (RSD)		0,062 (3,26)	SD (RSD)		0,045 (1,8)

Hodnoty RSD 3,26 % resp. 1,8 % ukazují na dobrou reprodukovatelnost metody a vhodnost jejího použití pro naši studii.

7.2 Optimalisace podmínek pro stanovení proteinových hydroperoxidů metodou G-PCA-FOX

Vliv teploty a skladování materiálu

Při stanovení koncentrace proteinových hydroperoxidů v závislosti na teplotě a délce skladování jsme zvolili teploty -80 °C, -20 °C a +4 °C, při kterých jsme sledovali změnu koncentrace POOH v závislosti na čase.

Tabulka 18: Vliv teploty a délky skladování na konečnou koncentraci proteinových hydroperoxidů

Doba uskladnění (dny)	Teplota uskladnění		
	4 °C	-20 °C	-80 °C
	Koncentrace POOH [$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$]		
1	3,56 ± 0,01	3,56 ± 0,02	3,56 ± 0,01
2	2,03 ± 0,01	3,01 ± 0,01	3,49 ± 0,01
3	1,65 ± 0,01	2,85 ± 0,02	3,48 ± 0,01
4	0,99 ± 0,02	2,80 ± 0,02	3,49 ± 0,01
5	0,91 ± 0,01	2,72 ± 0,01	3,48 ± 0,03
6	0,87 ± 0,01	2,51 ± 0,02	3,47 ± 0,02
7	0,79 ± 0,01	2,30 ± 0,01	3,47 ± 0,01
14	0,77 ± 0,02	1,19 ± 0,03	3,45 ± 0,01
21	0,71 ± 0,01	0,86 ± 0,04	3,31 ± 0,01
28	0,69 ± 0,05	0,78 ± 0,02	2,74 ± 0,03
35	0,64 ± 0,03	0,67 ± 0,06	1,99 ± 0,04

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří naměřených hodnot ± SEM

Při měření stability POOH se stejně jako v případě LOOH ukázalo, že nejvhodnější teplota pro uskladnění materiálu je -80 °C a doba maximálně 14 dnů. Při teplotě -20 °C došlo k poklesu koncentrace POOH již po jednom dni o 15,5 %, po 14 dnech pak až o 66,6 %. Při teplotě 4 °C došlo k poklesu koncentrace o 43 % již po jednom dni.

Vliv koncentrace dithioničitanu sodného na absorbanci blanku a vzorku POOH

Dithioničitan sodný má při stanovení POOH obdobnou úlohu jako TPP při stanovení LOOH. Vliv jeho koncentrace byl sledován pro 0,001M; 0,01M; 0,1M roztoky. Výsledky jsou uvedeny v tab. 19.

Tabulka 19: Vliv koncentrace dithioničitanu sodného na absorbanci blanku a vzorku proteinových hydroperoxidů

Koncentrace $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ [mol/dm ³]	$A_{(560)} \text{ blanku} - A_{(560)} \text{ vody}$	$A_{(560)} \text{ vzorku} - A_{(560)} \text{ blanku}$
0,001	0,190 ± 0,02	0,120 ± 0,01
0,01	0,149 ± 0,01	0,115 ± 0,02
0,1	0,146 ± 0,01	0,123 ± 0,01
0,5	0,148 ± 0,01	0,119 ± 0,01

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 naměřených hodnot ± SEM

Z tabulky 19 je zřejmé, že 0,01M roztok dithioničitanu sodného postačí k úplné redukcí POOH, čímž se zabrání nežádoucímu snížení naměřených hodnot. K redukcí LOOH jsme museli použít roztok TPP, který měl 10x vyšší koncentrací.

Vliv BHT v extrakční směsí na stanovení proteinových hydroperoxidů

Butylhydroxytoluen je jedním z antioxidačních činidel, které brání následné propagaci volných radikálů a tím nekontrolovatelné tvorbě dalších volných radikálů ve vzorku. Vzhledem k rozdílným názorům autorů dostupné literatury na přidávání BHT do reakčních činidel jsme ověřili vliv BHT i na množství POOH měřených metodou G-PCA-FOX .

Tabulka 20: Vliv přidání BHT do methanolu a chloroformu na celkové množství proteinových hydroperoxidů

	$A_{(560)} \text{ blanku} - A_{(560)} \text{ vody}$	$A_{(560)} \text{ vzorku} - A_{(560)} \text{ blanku}$
v přítomnosti BHT	0,176 ± 0,01	0,118 ± 0,02
bez přítomnosti BHT	0,193 ± 0,01	0,154 ± 0,02

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze tří naměřených hodnot ± SEM

Z tabulky 20 je patrné, že ve vzorku, do kterého nebyl přidán BHT, došlo k nárůstu absorbance o 23 %. Samotná absorbance blanku se také nepatrně zvýšila. Z tohoto důvodu můžeme usuzovat, že i BHT se svými antioxidačními účinky podílí na redukcí proteinových hydroperoxidových skupin v blanku.

Stanovení reprodukovatelnosti metody G-PCA-FOX

Před zavedením metody G-PCA-FOX do laboratorní praxe bylo nutné určit její reprodukovatelnost. Použili jsme stejné krevní vzorky jako u stanovení reprodukovatelnosti metody M-PCA-FOX. Výsledky ukazuje tab.21.

Tabulka 21: Reprodukovatelnost metody G-PCA-FOX

Zdravá kontrola		
Vzorek	A	c [$\mu\text{mol/l}$]
V1	0,076	1,48
V2	0,07	1,37
V3	0,08	1,56
V4	0,083	1,62
V5	0,072	1,41
V6	0,069	1,35
V7	0,081	1,58
V8	0,077	1,5
V9	0,079	1,54
V10	0,085	1,66
průměr		1,51
SD (RSD)		0,085 (5,6)

Septický pacient		
Vzorek	A	c [$\mu\text{mol/l}$]
V1	0,155	3,02
V2	0,159	3,11
V3	0,16	3,13
V4	0,157	3,07
V5	0,161	3,14
V6	0,149	2,91
V7	0,153	2,99
V8	0,155	3,02
V9	0,16	3,13
V10	0,158	3,09
průměr		3,06
SD (RSD)		0,061 (1,99)

Hodnoty RSD 5,6 % resp. 2,0 % ukazují na dobrou reprodukovatelnost metody a vhodnost jejího použití pro naši studii.

7.3 Stanovení koncentrace produktů lipidových a proteinových peroxidací v klinické studii

7.3.1 Charakteristika sledovaného souboru

Mezi sledované parametry osob jsme zahrnuli věk, pohlaví, intenzitu odpovědi na zánět (CRP), závažnost sepse (APACHE II skóre), celkovou koncentraci cholesterolu, koncentraci HDL a LDL cholesterolu (viz tab. 22). Do klinické studie bylo zařazeno 13 septických pacientů, jejichž věkový průměr byl 66,1 let (8 mužů, 7 žen). K nim byly vybrány vhodné neseptické kontroly (průměrný věk 64,4 let) a ambulantní kontroly (průměrný věk 65,8 let). Párování osob ve skupinách bylo provedeno na základě pohlaví, věku a hodnoty APACHE II skóre. U septických pacientů byl krevní vzorek odebírán 3x (1. odběr – v okamžiku, kdy byla diagnostikována sepe, 2. odběr – 7 dní od 1. odběru, 3. odběr – po odeznění sepse). Třetí odběr byl proveden pouze u 8 pacientů, kteří se uzdravili. Pět pacientů zemřelo.

Koncentrace CRP byla nejvyšší u septických pacientů v rámci 1. odběru. Během 2. a 3. odběru její hodnota klesala v závislosti na zlepšování celkového zdravotního stavu. Koncentrace CRP se během 3. odběru blížila k hodnotám ambulantních kontrol.

Koncentrace celkového cholesterolu u pacientů v sepsi při 1. odběru byla o 33 % nižší než při 3. odběru ($p < 0,001$); v porovnání s ambulantními kontrolami byla signifikantně snížena u všech odběrů ($p < 0,001$).

Koncentrace HDL a LDL cholesterolu byly u pacientů v sepsi v porovnání s ambulantními kontrolami také signifikantně sníženy během všech tří odběrů. Obě koncentrace vzrůstaly v závislosti na pozitivním vývoji zdravotního stavu pacienta. (viz tab. 22).

Tabulka 22: Klinicko-biochemické parametry septických pacientů, neseptických a ambulantních kontrol

PARAMETR	SI	SII	SIII	AK	NK
počet osob	13	11	8	13	5
pohlaví (m/ž)	8/5	8/5	8/5	8/5	3/2
věk	66,1 ± 15,20	66,1 ± 15,20	66,1 ± 15,20	65,8 ± 16,10	64,4 ± 19,50
APACHE II skóre	17,9 ± 5,9	nehodnotí se	nehodnotí se	nehodnotí se	14,8 ± 2,10
CRP	182,23 ± 137,71	76,81 ± 72,89	14,30 ± 5,93	4,25 ± 3,24	46,4 ± 73,35
Celkový cholesterol (mmol/l)	2,95 ± 0,75****	3,30 ± 1,10***	4,40 ± 0,98***	5,58 ± 1,15	4,60 ± 1,19
HDL (mmol/l)	0,64 ± 0,27***	0,63 ± 0,27***	0,93 ± 0,28*	1,40 ± 0,40	1,17 ± 0,23
LDL (mmol/l)	1,68 ± 0,61***	1,68 ± 0,92** +	2,73 ± 0,72*	3,54 ± 0,84	2,31 ± 1,35

SI - sepse 1. odběr, SII - sepse 2. odběr, SIII - sepse 3. odběr, AK - ambulantní kontroly, NK - neseptické kontroly, CRP - C-reaktivní protein, HDL - HDL cholesterol, LDL - LDL cholesterol, APACHE II skóre - Acute Physiologic And Chronic Health Evaluation, * $p < 0,05$ vs AK, *** $p < 0,001$ vs AK, + $p < 0,05$ vs SIII, **** $p < 0,001$ vs SIII.

7.3.2 Koncentrace lipidových hydroperoxidů

V tab. 23 je uvedeno srovnání koncentrace LOOH u pacientů v sepsi, kriticky nemocných pacientů a ambulantních kontrol. U pacientů v sepsi (1. odběr) byla koncentrace LOOH v porovnání s ambulantními kontrolami signifikantně zvýšena ($p < 0,001$), stejně jako u druhých a třetích odběrů ($p < 0,001$). Signifikantní rozdíl byl pozorován i ve skupině septických pacientů při prvním (SI) a třetím (SIII) odběru ($p < 0,001$). Rozdíl v koncentraci LOOH mezi skupinou septických pacientů (1. odběr) a skupinou neseptických kontrol byl také signifikantní ($p < 0,05$), ale v případě této skupiny pacientů bychom měli zohlednit malý počet osob, který byl ve skupině NK sledován.

Tabulka 23: Koncentrace lipidových hydroperoxidů v séru

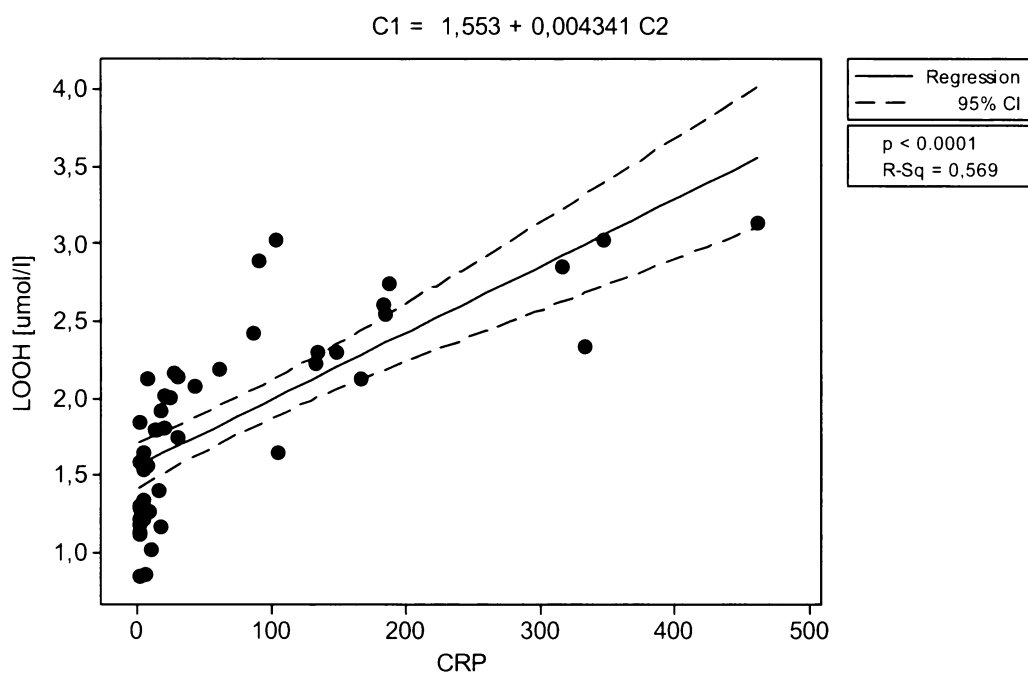
LOOH ($\mu\text{mol/dm}^3$)	SI (n = 13)	SII (n = 11)	SIII (n = 8)	AK (n = 13)	NK (n = 5)
	2,41 ± 0,37***	2,27 ± 0,28***	1,53 ± 0,24*** +	1,17 ± 0,17	1,63 ± 0,28 ⁺

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, n = počet osob ve skupině, LOOH – lipidové hydroperoxydy, SI – sepse 1. odběr, SII – sepse 2. odběr, SIII – sepse 3. odběr, AK – ambulantní kontrola, NK – neseptická kontrola, *** $p < 0,001$ vs AK, + $p < 0,05$ vs SI, +++ $p < 0,001$ vs SI

Korelace mezi koncentracemi lipidových hydroperoxidů a C-reaktivního proteinu

V grafu 2 je znázorněna korelace mezi koncentrací LOOH a CRP, který je jedním z ukazatelů přítomnosti infekce v organismu a má význam při monitorování průběhu nemoci. Mezi koncentrací LOOH a CRP byla nalezena pozitivní korelace ($p < 0,0001$).

Graf 2: Korelace mezi koncentracemi lipidových hydroperoxidů a CRP



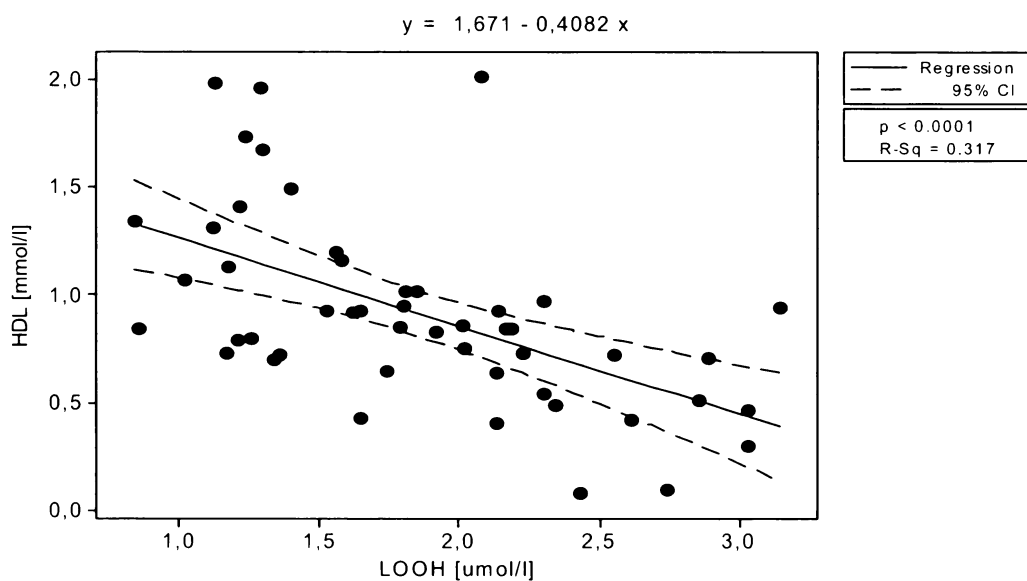
Korelace mezi koncentracemi lipidových hydroperoxidů a HDL cholesterolu

V grafu 3 je znázorněna korelace mezi koncentracemi LOOH u zkoumaných skupin pacientů a množstvím HDL cholesterolu. Mezi těmito parametry byla prokázána negativní korelace ($p < 0,0001$).

Korelace mezi koncentracemi lipidových hydroperoxidů a LDL cholesterolu

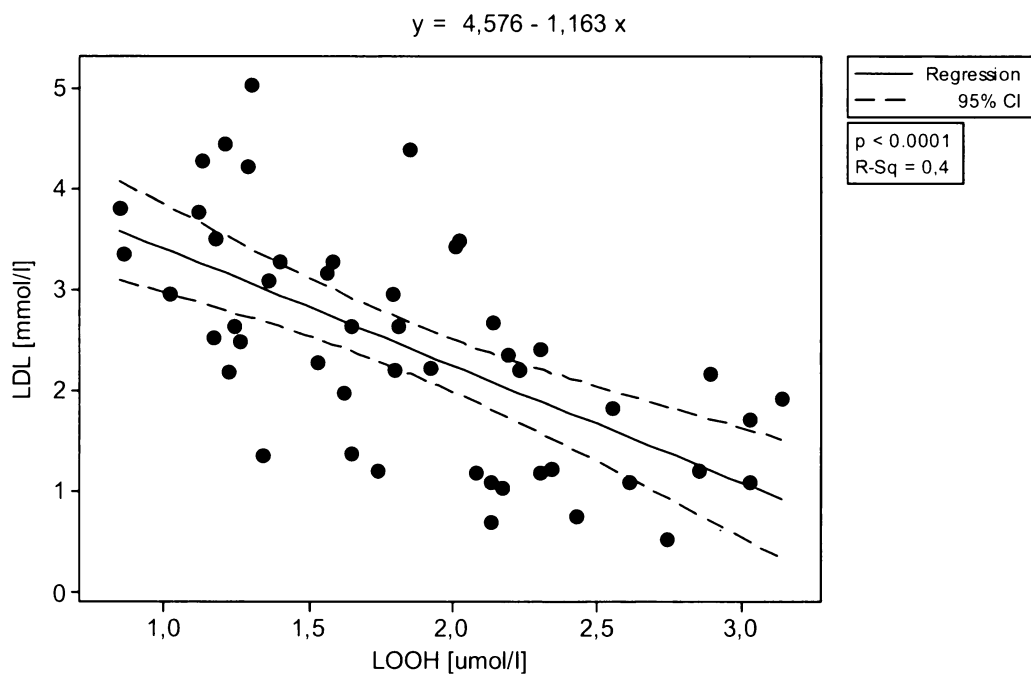
Mezi koncentracemi LOOH a LDL cholesterolu byla prokázána negativní korelace ($p < 0,0001$), viz. graf 4.

Graf 3: Korelace mezi koncentrací LOOH a HDL cholesterolu



HDL – HDL cholesterol, LOOH – lipidové hydroperoxydy, CI - interval spolehlivosti

Graf 4: Korelace mezi koncentrací LOOH a hladinou LDL cholesterolu



LDL – LDL cholesterol, LOOH – lipidové hydroperoxydy, CI - interval spolehlivosti

7. 3. 3. Koncentrace proteinových hydroperoxidů

Tabulka 24 ukazuje srovnání koncentrace POOH u pacientů se sepsí, ambulantních a neseptických kontrol. Koncentrace POOH u pacientů v sepsi byla signifikantně zvýšena při 1., 2. i 3. odběru ($p < 0,001$, resp. $< 0,01$) v porovnání s ambulantními kontrolami; klesala s lepším se zdravotním stavem pacienta. Signifikantní rozdíl byl pozorován i mezi prvním a třetím odběrem ve skupině septických pacientů ($p < 0,001$). Rozdíl v koncentraci POOH mezi skupinou septických pacientů (1. odběr) a skupinou neseptických kontrol byl také signifikantní ($p < 0,05$), ale i zde bychom měli zohlednit malý počet osob, který byl ve skupině NK sledován.

Tabulka 24: Koncentrace proteinových hydroperoxidů

POOH ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	SI (n = 13)	SII (n = 11)	SIII (n = 8)	AK (n = 13)	NK (n = 5)
	$3,65 \pm 0,57^{***}$	$2,91 \pm 0,33^{***}$	$2,04 \pm 0,21^{***+}$	$1,62 \pm 0,2$	$2,43 \pm 0,25^+$

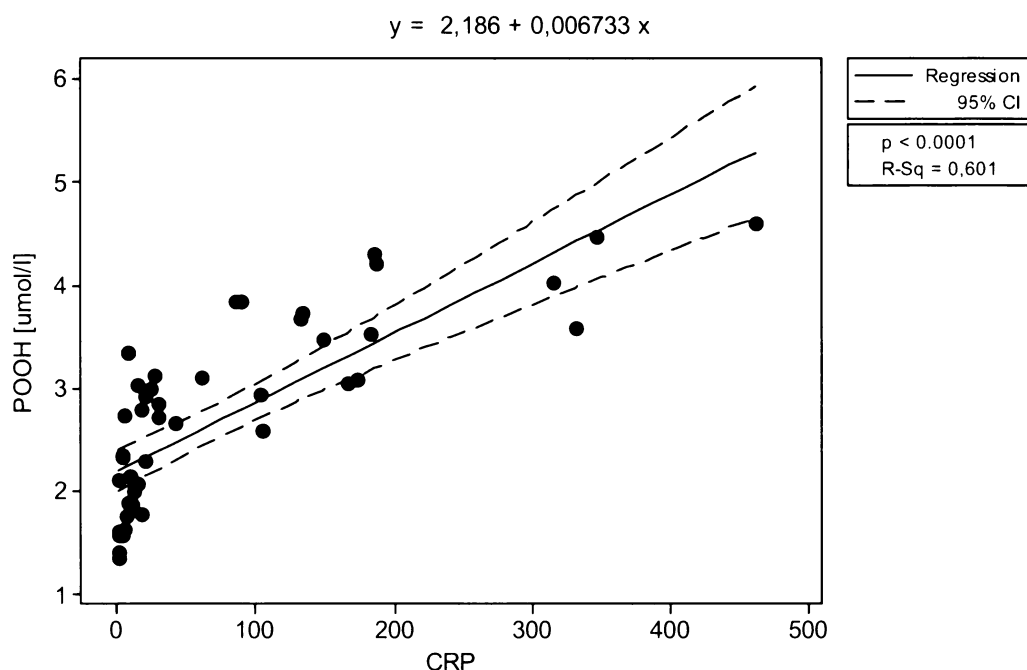
*Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm SEM, n = počet osob ve skupině, POOH – lipidové hydroperoxydy, SI – sepse 1. odběr, SII – sepse 2. odběr, SIII – sepse 3. odběr, AK - ambulantní kontrola, NK – neseptická kontrola, ** $p < 0,01$ vs AK, *** $p < 0,001$ vs AK, +++ $p < 0,001$ vs SI, + $p < 0,05$ vs SI*

Korelace mezi koncentracemi proteinových hydroperoxidů a C-reaktivního proteinu

Vzhledem k tomu, že koncentrace POOH byla u skupiny sledovaných pacientů nejvyšší v okamžiku záchytu septického onemocnění a klesala s pozitivním vývojem zdravotního stavu pacienta, sledovali jsme korelaci mezi koncentracemi POOH a CRP, který je ukazatelem přítomnosti infekce v organismu.

V grafu 5 je znázorněna pozitivní korelace ($p < 0,0001$) mezi koncentracemi POOH a CRP.

Graf 5: Korelace mezi koncentracemi POOH a CRP



CRP -- C-reaktivní protein, POOH – proteinové hydroperoxydy, CI - interval spolehlivosti

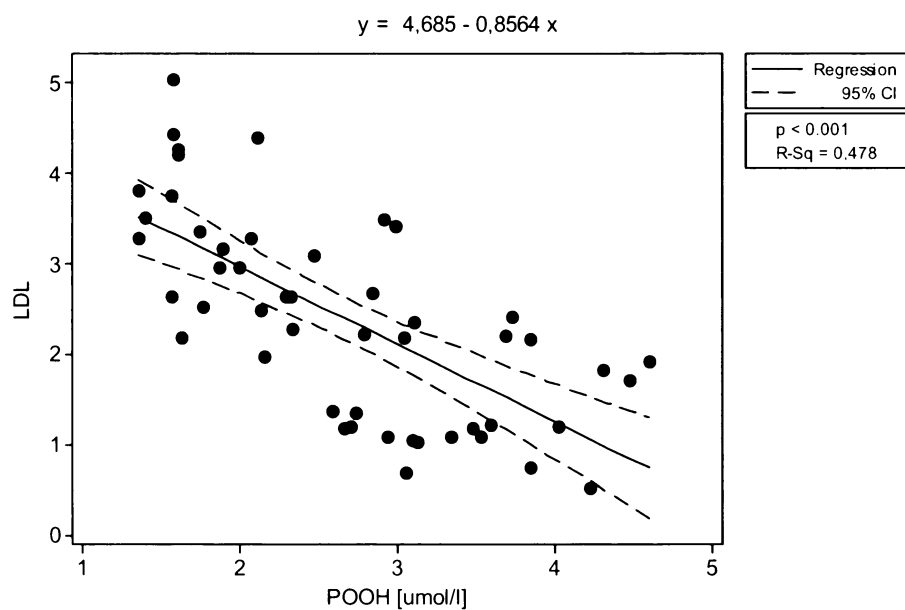
Korelace mezi koncentracemi proteinových hydroperoxidů a HDL cholesterolu

V grafu 6 je znázorněna korelace mezi koncentracemi POOH u zkoumaných skupin pacientů a množstvím HDL cholesterolu. Mezi těmito parametry byla prokázána negativní korelace ($p < 0,001$).

Korelace mezi koncentracemi proteinových hydroperoxidů a LDL cholesterolu

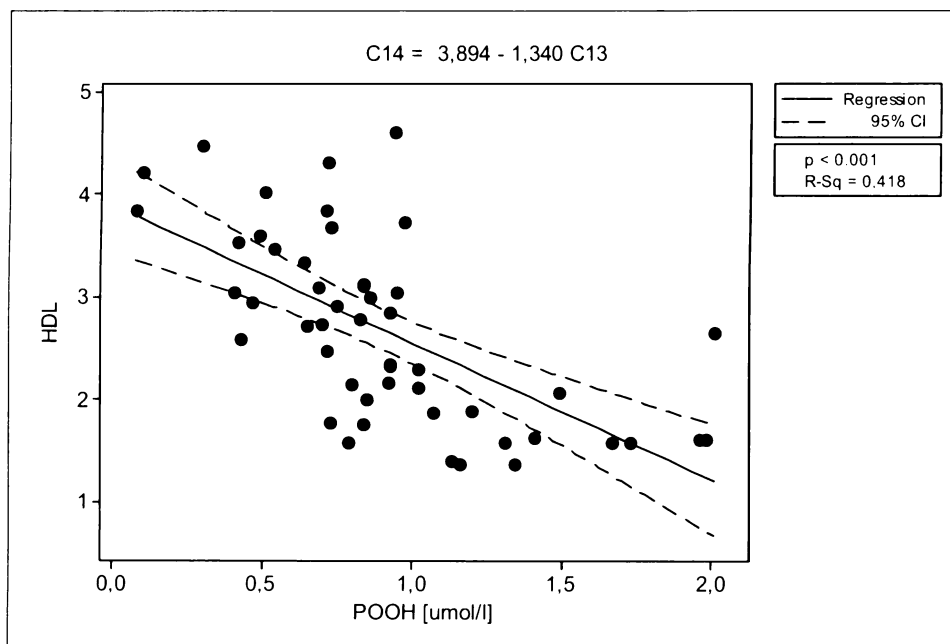
Mezi koncentracemi POOH a LDL cholesterolu byla prokázána negativní korelace ($p < 0,001$), viz. graf 7.

Graf 6: Korelace mezi koncentracemi proteinových hydroperoxidů a LDL cholesterolu



LDL – LDL cholesterol, POOH – proteinové hydroperoxydy, CI - interval spolehlivosti

Graf 7: Korelace mezi koncentracemi proteinových hydroperoxidů a HDL cholesterolu



HDL – HDL cholesterol, POOH – proteinové hydroperoxydy, CI - interval spolehlivosti

7. 3. 4. Koncentrace konjugovaných dienů

Tabulka 25 ukazuje srovnání koncentrace konjugovaných dienů u sledovaných skupin pacientů v séru u nichž byla diagnostikována sepse (SI), ambulantních kontrol (AK) a neseptických kontrol (NK). Ani u jedné z uvedených skupin nebyla zjištěna signifikance v porovnání s ambulantními kontrolami.

Tabulka 25: Koncentrace konjugovaných dienů

CD ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	SI (n = 13)	SII (n = 11)	SIII (n = 8)	AK (n = 13)	NK (n = 5)
	52,94 ± 12,26	56,17 ± 17,96	55,76 ± 16,51	60,34 ± 11,44	52,14 ± 11,65

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, n = počet osob ve skupině, CD – konjugované dieny, SI – sepse 1. odběr, SII – sepse 2. odběr, SIII – sepse 3. odběr, AK – ambulantní kontrola, NK – neseptická kontrola

Korelace mezi koncentracemi konjugovaných dienů a HDL cholesterolu

V grafu 8 je znázorněna korelace mezi koncentracemi konjugovaných dienů a HDL cholesterolu u zkoumaných skupin pacientů. Mezi těmito parametry byla prokázána negativní korelace ($p < 0,001$).

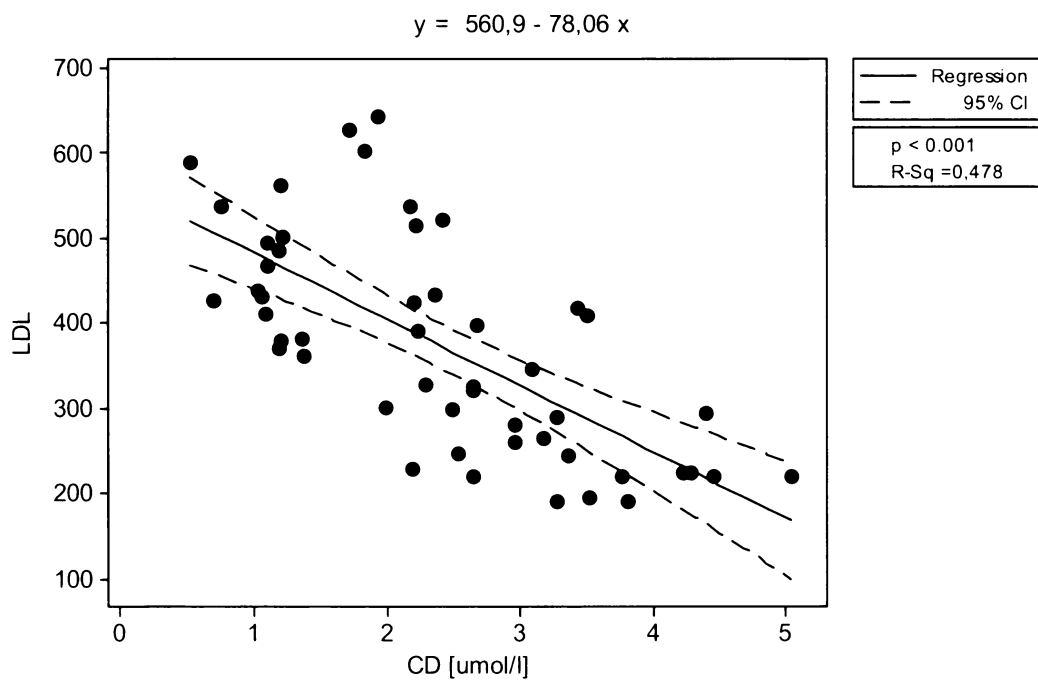
Korelace mezi koncentracemi konjugovaných dienů a LDL cholesterolu

Mezi koncentracemi konjugovaných dienů a LDL cholesterolu byla prokázána negativní korelace ($p < 0,001$), viz. graf 9.

Korelace mezi koncentracemi konjugovaných dienů a CRP

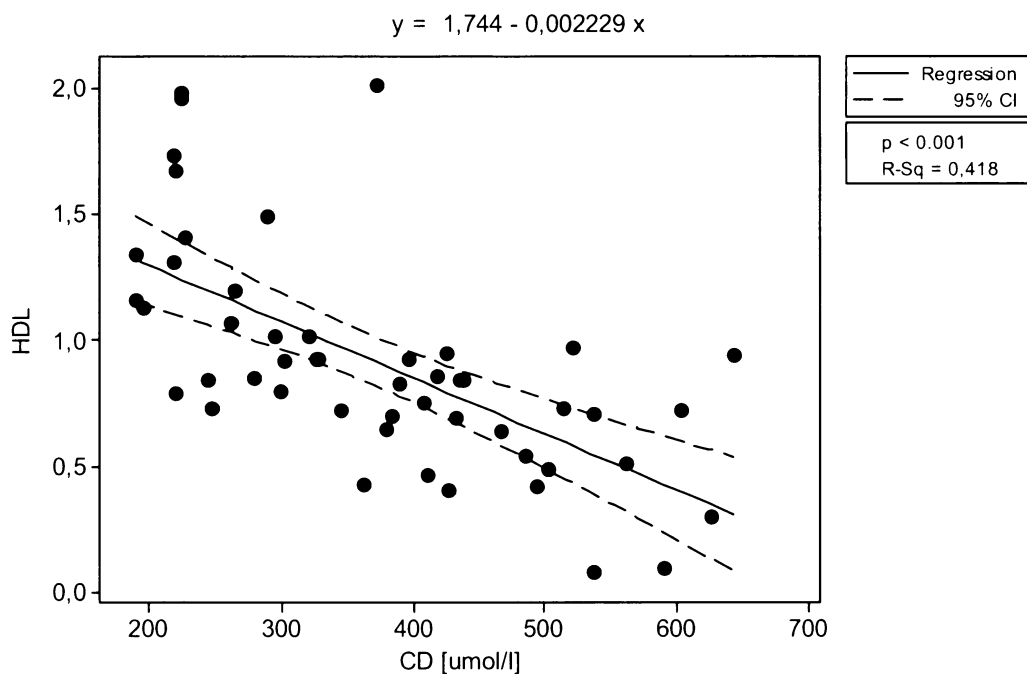
V grafu 10 je znázorněna korelace mezi koncentracemi konjugovaných dienů u zkoumaných skupin pacientů a hladinou CRP. Mezi těmito parametry byla prokázána pozitivní korelace ($p < 0,001$).

Graf 8: Korelace mezi koncentrací konjugovaných dieny a LDL cholesterolu



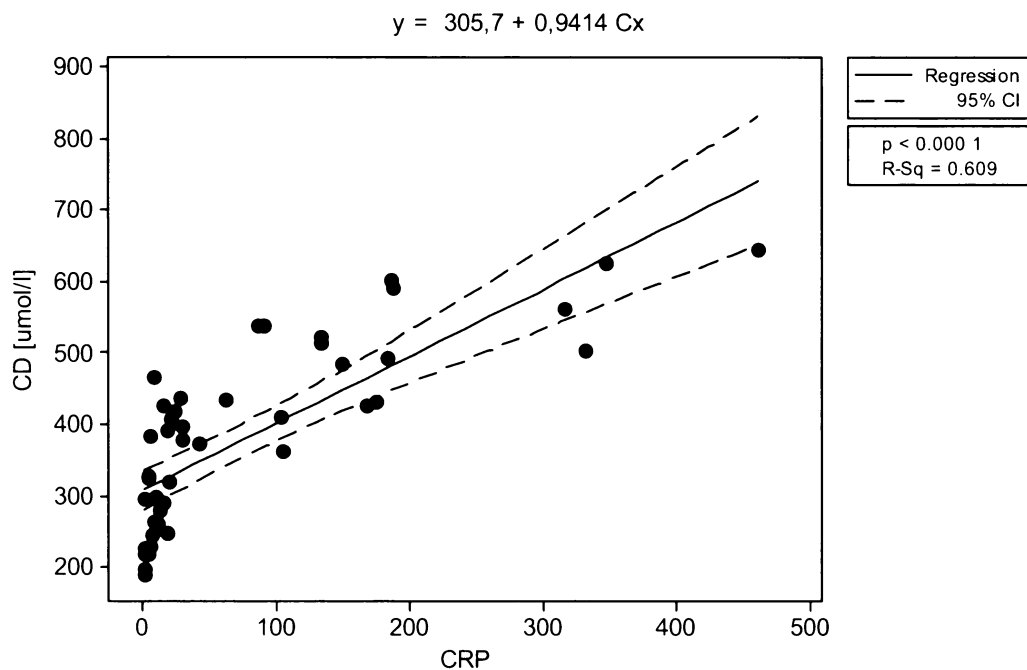
LDL - LDL cholesterol CD - konjugované dieny, CI - interval spolehlivosti

Graf 9: Korelace mezi koncentrací konjugovaných dieny a HDL cholesterolu



HDL - HDL cholesterol, CD - konjugované dieny, CI - interval spolehlivosti

Graf 10: Korelace mezi koncentrací konjugovaných dienu a hladinou CRP

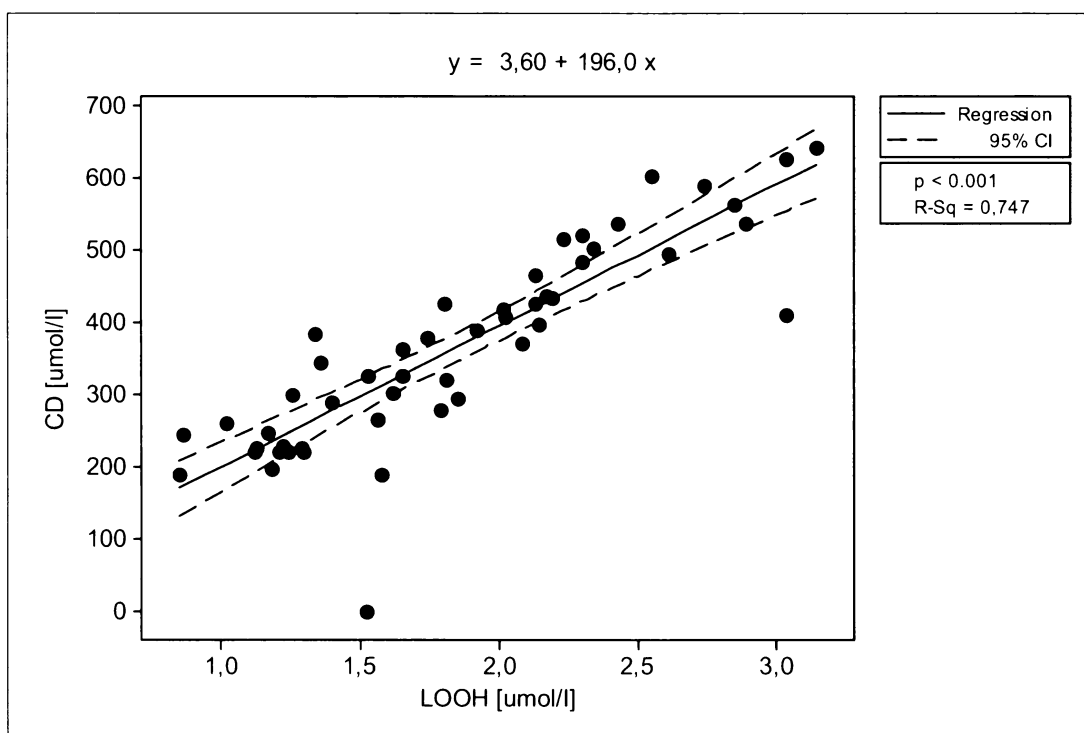


CD – konjugované dieny, CRP – C – reaktivní protein, CI - interval spolehlivosti

Korelace mezi koncentracemi LOOH a konjugovaných dienu

Konjugované dieny jsou jedním z produktů lipidových peroxidací a proto byla zjišťována vzájemná korelace mezi koncentrací LOOH a koncentrací konjugovaných dienu v séru vybraných skupin pacientů. Mezi zmiňovanými hodnotami byla nalezena pozitivní korelace ($p < 0,001$).

Graf 11: Korelace mezi koncentracemi LOOH a konjugovaných dienu



CD – konjugované dieny, LOOH – lipidové hydroperoxydy, CI - interval spolehlivosti

7. 3. 5 Klinicko – biochemické parametry a produkty lipidových proteinových peroxidaci v závislosti na věku

V tabulce 26 jsou septičtí pacienti, ambulantní a neseptické kontroly rozděleni podle věku do dvou skupin – 1. skupina věk 30 – 70 let 2. skupina věk 70 – 85 let. Po provedení statistického zhodnocení daných parametrů jsme zjistili, že věk nemá signifikantní vliv na žádný ze sledovaných parametrů (koncentrace LOOH, koncentrace POOH, koncentrace konjugovaných dienu).

Tabulka 26: Koncentrace produktů lipidových a proteinových peroxidaci v závislosti na věku

PARAMETR	VĚK 30 – 70			VĚK 70 - 84		
	SI	AK	NK	SI	AK	NK
Pohlaví (M/F)	5/2	5/2	2/1	3/3	3/3	1/1
LOOH (μmol/l)	2,43 ± 0,4	1,18 ± 0,08	1,86 ± 0,15	2,41 ± 0,3	1,16 ± 0,22	1,56 ± 0,02
POOH (μmol/l)	3,67 ± 0,62	1,52 ± 0,13	2,7 ± 0,27	3,62 ± 0,46	1,9 ± 0,52	2,22 ± 0,09
CD (μmol/l)	58,99 ± 12,2	64,01 ± 10,72	51,36 ± 3,09	45,89 ± 7,15	56,28 ± 10,3	53,49 ± 14,55

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, LOOH – lipidové hydroperoxydy, POOH – proteinové hydroperoxydy, CD – konjugované dieny, SI – sepse 1. odběr, AK - ambulantní kontrola, NK – neseptická kontrola

7. 3. 6 Klinicko-biochemické parametry v závislosti na pohlaví

V tabulce 27 jsou uvedeny klinicko-biochemické parametry, které byly v naší studii zkoumány v závislosti na pohlaví. U skupiny septických pacientů nebyl nalezen vliv pohlaví na žádný ze sledovaných atributů. Ve skupině ambulantních kontrol (ženy) jsme zjistili signifikantní rozdíl v porovnání s ambulantními kontrolami (muži) v koncentraci LDL cholesterolu ($p < 0,05$) a HDL cholesterolu ($p < 0,01$).

Tabulka 27: Klinicko–biochemické parametry v závislosti na pohlaví

PARAMETR	MUŽI		ŽENY	
	SI	AK	SI	AK
počet osob	8	8	5	5
APACHE II	15,75 ± 3,88	nehodnotí se	21,40 ± 7,20	nehodnotí se
CRP	168,85 ± 110,45	5,87 ± 3,94	203,64 ± 185,64	2,64 ± 0,82
Cholesterol (mmol/l)	2,72 ± 0,80	5,27 ± 1,19	3,31 ± 0,55	6,48 ± 0,87
HDL (mmol/l)	0,55 ± 0,29	1,13 ± 0,22 **	0,75 ± 0,19	1,79 ± 0,13
LDL (mmol/l)	1,44 ± 0,53	3,17 ± 0,59 *	2,08 ± 0,55	4,13 ± 0,89
LOOH (μmol/l)	2,41 ± 0,37	1,19 ± 0,18	2,41 ± 0,34	1,13 ± 0,13
POOH (μmol/l)	3,7 ± 0,55	1,64 ± 0,24	3,56 ± 0,55	1,59 ± 0,02
CD (μmol/l)	53,24 ± 7,54	64,04 ± 1279	52,45 ± 16,28	44,85 ± 18,52

Hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, SI - sepse 1. odběr, AK – ambulantní kontrola, APACHE II skóre - Acute Physiologic And Chronic Health Evaluation, CRP - C-reaktivní protein, HDL - HDL cholesterol, LDL – LDL cholesterol, LOOH – lipidové hydroperoxydy, POOH – proteinové hydroperoxydy, CD – konjugované dieny

** $p < 0,01$ AK muži vs AK ženy, * $p < 0,05$ AK muži vs AK ženy

7. 3. 7 Zkoumané parametry v závislosti na zdroji sepse

Pro statistické vyhodnocení parametrů v závislosti na zdroji sepse byla skupina 13 septických pacientů rozdělena do dvou skupin dle zdroje infekce: plíce (n = 7) a jiné orgány (n = 6). Po statistickém zpracování uvedených parametrů bylo zjištěno, že zdroj sepse nemá vliv na koncentraci produktů lipidových peroxidací, CRP, celkového i HDL a LDL cholesterolu.

Tabulka 28: Zkoumané parametry a zdroj sepse

Parametr	Plíce	Jiné orgány
CRP (mg/l)	154,54 ± 88,12	214,53 ± 184,04
cholesterol (mmol/l)	2,94 ± 0,85	2,96 ± 0,70
LDL (mmol/l)	1,71 ± 0,66	1,65 ± 0,60
HDL (mmol/l)	0,62 ± 0,29	0,66 ± 0,28
LOOH (μmol/l)	2,33 ± 0,12	2,5 ± 0,5
POOH (μmol/l)	3,68 ± 0,32	3,61 ± 0,73
CD (μmol/l)	50,75 ± 8,42	55,49 ± 14,46

CRP – C-reaktivní protein, LDL – LDL cholesterol, HDL – HDL cholesterol, LOOH – lipidový hydroperoxid, POOH – proteinový hydroperoxid, CD – konjugovaný dien

8 DISKUSE

Úkolem této diplomové práce bylo stanovit koncentrace produktů lipidových a proteinových peroxidací za podmínek oxidačního stresu, který úzce souvisel se septickým stavem.

Studie byla zaměřena na zhodnocení oxidačního stresu u vybraných skupin pacientů (septičtí pacienti, kriticky nemocní pacienti bez příznaků sepse, ambulantní kontroly). Septičtí pacienti jsou vystaveni výrazně zvýšenému působení volných radikálů. Zvýšená nadprodukce volných radikálů může být zapříčiněna aktivovanými fagocyty, které při zánětlivé odpovědi produkují velké množství superoxidu; ten se mění na další reaktivní sloučeniny kyslíku. Další příčinou může být reperfuse (např. během ischemie dochází ke konverzi xanthin oxidoreduktasy na xanthinoxidasu, která má schopnost tvořit ROS) [14].

Metoda pro stanovení koncentrace konjugovaných dienů byla zavedena podle práce Wielanda a Seidela [69]. Při stanovení koncentrace produktů lipidových a proteinových hydroperoxidů jsme vycházeli z několika publikovaných prací [31, 40, 41, 44, 45, 46, 47]. Jako stěžejní jsme vybrali metodu M-PCA-FOX pro stanovení produktů lipidových peroxidací a metodu G-PCA-FOX pro stanovení produktů proteinových peroxidací podle Gaye a Gebickiho [31]. Během optimalisace podmínek stanovení LOOH a POOH jsme však zjistili, že některé parametry, které významně ovlivňují samotné stanovení a i následné množství produktů lipidových a proteinových peroxidací, nebyly dostatečně ve zmíněných pracech popsány. Tyto parametry musely být před začátkem klinické studie upřesněny. Jednalo se o ověření doby a teploty skladování séra, vliv rozpouštědla a koncentrace TPP, vliv koncentrace dithioničitanu sodného, vliv koncentrace HClO_4 a vliv přítomnosti BHT na měřené hodnoty koncentrací LOOH a POOH.

Dříve než jsme začali odebírat vzorky od sledovaných skupin pacientů, bylo nutné ověřit stabilitu stanovovaných parametrů v odebraném vzorku tělní tekutiny. V naší studii jsme ověřovali stabilitu LOOH a POOH v séru při různých teplotách a délce uskladnění.

Výsledky ukázaly, že koncentrace LOOH a POOH postupně klesá v závislosti na délce skladování. Rychlost poklesu koncentrace LOOH a POOH je významně ovlivněna teplotou skladování. Nejvhodnější teplota pro skladování vzorků séra byla při $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Během dvou týdnů se koncentrace LOOH a POOH měnila jen minimálně. K významnému poklesu docházelo až během 3. a 4. týdne skladování. Skladování při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ se ukázalo pro skladování vzorků naprosto nevhodné, docházelo k výraznému poklesu hladin

LOOH i POOH. Nepotvrdili jsme tedy výsledky jiných autorů, kteří uvádějí, že koncentrace LOOH je stabilní několik měsíců při -80 °C [31], 1 měsíc při -20 °C [44] nebo několik měsíců při 4 °C [40]. Pro podmínky klinické laboratoře doporučujeme stanovení LOOH a POOH ze zamraženého séra. Skladování séra doporučujeme maximálně 2 týdny při -80 °C.

Trifenyfosfin a dithioničitan sodný jsou využívány v blankovém roztoku k redukci peroxidových skupin lipidů a proteinů, které by zvýšením absorbance blanku rušily stanovení. Trifenyfosfin byl použit k redukci LOOH v několika publikacích [31, 46, 65]. V žádné z nich však nebyl řešen problém rozpouštědla pro TPP. Trifenyfosfin je látka, která se v polárních rozpouštědlech prakticky nerozpouští. V naší studii jsme zjistili, že druh rozpouštědla TPP má významný vliv na hodnotu absorbance blanku; cílem bylo její snížení na minimum. Jako nejvhodnější rozpouštědlo se ukázal chloroform, ve kterém je TPP velmi dobře rozpustný a absorbance blanku byla za daných podmínek nejnižší.

Dalším důležitým faktorem, který má významný vliv na koncentraci LOOH, je koncentrace TPP. V jedné z publikovaných prací bylo uvedeno, že vhodná koncentrace TPP pro redukci LOOH v blanku je 1mM [31]. Z našich měření však vyplynulo, že vhodnější je 0,1M roztok TPP v chloroformu. Při této koncentraci je absorbance blanku nižší, tudíž se můžeme domnívat, že tato koncentrace zajistí redukci většího počtu LOOH. Další zvyšování koncentrace TPP naopak vedlo k nárůstu absorbance blanku. Tento jev můžeme odůvodnit tím, že s rostoucí koncentrací TPP v chloroformu vzrůstá intenzita žlutého zbarvení roztoku, což má vliv na zvýšení absorbance blanku.

Doporučená 1mM koncentrace dithioničitanu sodného pro stanovení hladiny POOH podle Gaye a Gebickiho [31] byla upravena na 10mM, protože při této koncentraci byla opět zjištěna nejnižší absorbance blankového roztoku. Vzhledem k hydrofilnímu charakteru analytu jsme pracovali s vodnými roztoky. Pro redukci proteinových hydroperoxidů postačila 10mM koncentrace redukčního činidla (dithioničitan sodný), zatímco pro redukci lipidových hydroperoxidů jsme museli připravit redukční činidlo (TPP) o koncentraci 100mM.

Další často diskutovanou otázkou v literatuře je, zda je nutné přidávat do reakční směsi BHT. Někteří autoři zastávají názor, že přítomnost antioxidačního činidla BHT v reakční směsi je nezbytná [31, 41, 46, 69], jiní se přiklánějí k názoru, že přídavek BHT nemá na konečnou koncentraci produktů peroxidací vliv [40, 44, 65, 70]. Z našeho měření vyplynulo, že přidání antioxidačního činidla BHT do reakční směsi při stanovování LOOH

a POOH metodami M-PCA-FOX a G-PCA-FOX ovlivňuje konečné koncentrace LOOH a POOH. Ve vzorku i v blankovém roztoku, do kterého bylo přidáno definované množství BHT, byly naměřeny nižší absorbance. Z toho usuzujeme, že BHT brání propagaci a tím i vzniku dalších hydroperoxidů.

Dalším, velice citlivým parametrem, na kterém jsou metody založené na tvorbě komplexu železitých iontů s xylenolovou oranží závislé, je pH reakčního prostředí. Publikované hodnoty pH se vzájemně liší stejně jako druh kyseliny [31, 40, 41, 42, 44, 46, 65, 69, 70]. Stanovili jsme koncentraci LOOH v závislosti na koncentraci kyseliny chloristé a zjistili, že nejvhodnější je koncentrace 110 mM [31, 71]. Při nižších i vyšších koncentracích docházelo k poklesu absorbance barevného komplexu a tím ke snížení citlivosti metody. Vzhledem k tomuto faktu jsme museli upravit koncentraci zásobního roztoku kyseliny chloristé z původní 2M [31] na 2,093M, abychom zachovali konstantní objem měřeného vzorku.

Do klinické studie byli zařazeni pacienti v sepsi, ke kterým byly vybírány ambulantní kontroly a kriticky nemocní pacienti odpovídajícího věku a pohlaví. Kriticky nemocní pacienti museli navíc splňovat kritérium shodného APACHE II skóre se septickými pacienty. APACHE II skóre se stanovovalo pro potvrzení probíhající sepse a pro určení její závažnosti. APACHE II skóre také umožňuje předpovědět pravděpodobnost úmrtí konkrétního pacienta [72]. Společně s jeho hodnotou byla u pacientů stanovena koncentrace CRP, který je obecně používán jako indikátor zánětu [26, 27]. U septických pacientů byly hladiny CRP zvýšeny a postupně s odezníváním příznaků septického onemocnění se navracely k fyziologickým hodnotám [28, 29, 30, 73]. Fyziologická hodnota CRP u ambulantních kontrol sloužila jako ukazatel absence zánětu.

Podobně jako v pracech jiných autorů byly i v naší studii plíce nejčastějším místem primární infekce. Plíce jsou vstupní branou pro mikroorganismy a tudíž i velice náchylným orgánem k infekci u pacientů, kteří jsou upoutáni na lůžko. Byly také jednou z příčin sepse u pacientů s větším množstvím primárních ložisek infekce. Další častá ložiska infekce u sledované skupiny pacientů byla v pankreatu (2), tenkém střevě (1) a v místě zavedení kanyly (2).

V rámci této klinické studie jsme se zaměřili na stanovení produktů lipidových a proteinových peroxidací u septických pacientů, kriticky nemocných pacientů a k nim odpovídajících ambulantních kontrol. V několika literárních zdrojích jsou zhodnoceny koncentrace POOH nebo LOOH u kriticky nemocných pacientů nebo pacientů v sepsi [74,

75]. Autoři těchto publikací se shodují, že u kriticky nemocných pacientů dochází k významnému zvýšení hladiny hydroperoxidů v porovnání se zdravými kontrolami, což je v souladu i s našimi výsledky.

Koncentrace LOOH a POOH jsou u pacientů v sepsi významně zvýšeny. V závislosti na zlepšujícím se zdravotním stavu pacienta dochází k poklesu jejich hladin k fyziologickým hodnotám (hodnotám u ambulantních kontrol). Koncentrace LOOH a POOH byly po uzdravení septického pacienta ve srovnání se skupinou ambulantních kontrol jen mírně zvýšeny. Koncentrace LOOH a POOH u septických pacientů a neseptických kontrol se významně lišily, s odezníváním sepse se k sobě přiblížily. Nízký počet neseptických kontrol však nedovoluje z tohoto nálezu vyvozovat závěry.

Dále bylo zjištěno, že koncentrace LOOH a POOH úzce souvisí s hladinou CRP. S rostoucími hladinami CRP se významně zvyšovaly i koncentrace LOOH a POOH. Korelace mezi koncentracemi CRP a produktů hydroperoxidací u onemocnění spojených s oxidačním stresem (kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, aterosklerosa) byly publikovány v řadě prací [76, 77, 78].

U pacientů v sepsi byla prokázána snížená hladina celkového, HDL i LDL cholesterolu [79, 80, 81, 82]. U produktů lipidových i proteinových peroxidací byla nalezena negativní korelace s koncentracemi LDL a HDL cholesterolu. Ke snížené hladině LDL u septických pacientů by mohlo docházet díky tomu, že lipidové, ale hlavně proteinové hydroperoxydy oxidují LDL. Oxidativně modifikovaný apo B je signálem pro vychytávání ox-LDL „zametacími“ (scavenger) receptory [83, 84, 85]. Oxidativně modifikované LDL jsou pohlcovány makrofágy, ty se pak mění v pěnové buňky, které jsou jednou z příčin aterosklerosy. Porušení rovnováhy v intimě by mohlo být příčinou snížené hladiny LDL v krvi. HDL cholesterol hraje důležitou roli v transportu cholesterolu do jater. Na druhou stranu, HDL v přítomnosti iontů mědi (Cu^{2+}) může způsobit oxidaci LDL částic *in vitro* a to způsobí, že makrofágy začnou akumulovat cholesterol [86, 87]. Byla rovněž popsána schopnost LOOH a POOH inhibovat za výše uvedených podmínek tvorbu konjugovaných dienu [87]. Pokud by k tomuto efektu docházelo také *in vivo*, mohlo by to částečně vysvětlit nesignifikantní rozdíly hladin konjugovaných dienu u jednotlivých skupin.

Dále jsme neprokázali závislost koncentrace LOOH, POOH ani CD na klinicko-biochemických parametrech (APACHE II skóre) ani na věku, pohlaví ani na zdroji sepse. U zdravých žen jsme pozorovali vyšší koncentrace HDL i LDL cholesterolu ve srovnání s muži, což je v souladu s literaturou [88].

9 SHRNU TÍ

V rámci této diplomové práce jsme zavedli nové metodiky pro stanovení lipidových hydroperoxidů metodou M-PCA-FOX a proteinových hydroperoxidů metodou G-PCA-FOX v séru a optimalisovali podmínky stanovení. Zjistili jsme maximální dobu a nejvhodnější teplotu skladování séra pro zmiňované metody. Upravili jsme koncentrace jednotlivých reagentů (kyseliny chloristé, trifenylofosfinu a dithioničitanu sodného) tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti metody.

V klinické studii, která sledovala oxidační stres u pacientů v sepsi, v průběhu septického onemocnění a po odeznění sepse, byly měřeny koncentrace produktů lipidových a proteinových peroxidací (LOOH, POOH a konjugovaných dienů). Byl prokázán nárůst koncentrace LOOH i POOH u pacientů v sepsi, která klesá se zlepšujícím se zdravotním stavem hospitalisovaného pacienta. Po odeznění sepse se hodnoty LOOH i POOH navrací k fyziologickým hodnotám (naměřených u ambulantních kontrol). Hladiny konjugovaných dienů nevykázaly žádné změny.

Byly zjištěny pozitivní korelace mezi LOOH i POOH a CRP. Negativně korelovaly LOOH i POOH s koncentracemi celkového, HDL a LDL cholesterolu. Nebyla zjištěna závislost hladin LOOH, POOH ani konjugovaných dienů na pohlaví, věku, původu sepse, ani na závažnosti septického stavu.

Rozhodnout, zda lze zavedených metod využít jako dalších parametrů podrobnější analýzy septických stavů (s ohledem na možnost terapeutické intervence) a diagnostiky sepse, bude možné pouze po dostatečném rozšíření jednotlivých skupin. Za současného stavu nemůžeme rozdíly hodnot mezi septickými pacienty a odpovídajícími neseptickými kontrolami považovat za průkazné.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Baynes J.W., Thorpe S.R.: *Diabetes*. 48, 1-9 (1999).
2. Yu B.P., Chung H.Y.: *Diabetes Res Clin Pract*. 54, 73-80 (2001).
3. Salvemini D., Cuzzocrea S.: *Free Radic Biol Med*. 33, 1173-1185, (2002).
4. Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B.: *Plant. Physiol*. 141, 330-335 (2006).
5. Černý V., Novák I., Cvachovec K.: *Sepsis v intensivní péči*, Maxdorf, Praha (2002).
6. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B.: *Crit. Care Med*. 20, 874 (1992).
7. Cohen J., Carlet J.: *Crit. Care Med*. 24, 1431-1440 (1996).
8. Štípek S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*, Maxdorf, Praha (2000).
9. Frei B.: *Am. J. Med*. 26, 5-28 (1994).
10. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: *Chem. Listy* 99, 455-466 (2005).
11. Brunori, M., Rotili, G.: *Methods Enzymol*. 105, 22-35 (1984).
12. Vladimirov Y.A.: *Biochemistry (Mosc)*. 69, 1-3 (2004).
13. Zorov D.B., Bannikova S.Y., Belousov V.V., Vyssokikh M.Y., Zorova L.D., Isaev N.K., Krasnikov B.F., Plotnikov E.Y.: *Biochemistry (Mosc)*. 70, 215-221 (2005).
14. Racek J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*, Maxdorf, Praha (2003).
15. Racek J., Holeček V.: *Chem. listy* 95, 774-780 (1999).
16. Hensley K., Floyd R.A.: *Arch. Biochem. Biophys*. 397, 377-383 (2002).
17. Gebicki S., Gebicki J. M.: *Biochem. J*. 338, 629-636 (1999).
18. Scandalios J. G.: *Braz. J. Med. Biol. Res*. 38, 995-1014 (2005).
19. Bulger E.M., Maier R.V.: *Arch. Surg*. 136, 1201-1207 (2001).
20. Hynková M.: *Stanovení aktivity antioxidantních enzymů u pacientů v sepsi*, Diplomová práce, PřF UK, Praha 2003.
21. Leeuwenburgh C., Heinecke J.W.: *Curr. Med. Chem*. 8, 829-838 (2001).
22. Zeman M., Žák A., Vecka M., Tvrzická E.: *Diabetes, oxidační stres, antioxidanty, Atherosklerosa 2005*, 1. LF UK Praha 2005.
23. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J.: *Chest*. 101, 1644-1655 (1992).
24. Kazda A., Valenta J., Brodská H., Stach Z., Hendl, J., Stráiteský, M.: *Klin. Biochem. Metab*. 13, 4-9 (2005).

25. Higgins T.L., Textbook of critical care. Shoemaker W.C., Ayres S.M., Grenvik A., and Holbrook 2069-2083 (2000).
26. Vojtic I., Krajnc S.: *Vetrinar. Archiv* 70, 151-157 (2000).
27. Husain T.M., Kim D.M.: *J. Orthop.* 15, 13-16 (2002)
28. Gaini S., Koldkjaer O.G., Pedersen C., Pedersen S.S.: *Crit. Care.* 10, 53-63 (2006).
29. Castelli G.P., Pognani C., Meisner M., Stuani A., Bellomi D., Sgarbi L.: *Crit. Care.* 8, 234-242, (2004)
30. Meisner M., Adina H., Schmidt J.: *Critical Care* 10, 1 – 10 (2006).
31. Gay C.A., Gebicki J.M.: *Anal. Biochem.* 315, 29-35 (2003).
32. Simpson J.A., Narita S., Gebicki S., Gebicki J.M., Dean R.T.: *Biochem. J.* 282, 621-624 (1992).
33. Pastorino A.M., Zamburlini A., Zennaro L., Maiorino M., Ursini F.: *Methods Enzymol.* 300, 33-43 (1999).
34. Wolff S.P., Garner, A.W., Fean T.: *Trends Biochem. Sci.* 11, 27 - 31 (1996).
35. Coffey M. D., Cole R. A., Colles S.M., Chisolm G. M.: *J. Clin.* 96, 1866–1873 (1995).
36. Lin F., Girotti A.W.: *Arch Biochem Biophys.* 300, 714-23 (1993).
37. Girotti A.W.: *J. Lipid Res.* 39, 1529-1543 (1998).
38. Dean R.T., Stocker R., Davies M.J.: *Biochem J.* 324, 1-18 (1997).
39. Porter N.A.: *Methods Enzymol.* 105, 273-282 (1984).
40. Gay C., Collins J., Gebicki J.M.: *Anal Biochem.* 273, 149-155 (1999).
41. Jiang Z.Y., Woollard A.C.: Wolff S.P., *Lipids.* 26, 853-856 (1991).
42. Cramer G.L., Miller J.F., Pendleton R.B., Lands W.E.: *Anal. Biochem.* 193, 204-211 (1991).
43. Chajes V., Sattler W., Stultschnig M., Kostner G.M.: *Atherosclerosis.* 121, 193-203 (1996).
44. Arab K., Steghens J.P.: *Anal Biochem.* 325, 158-163 (2004).
45. Jiang Z.Y., Woollard A.C., Wolff S.P.: *Lipids.* 325, 158-163 (2004).
46. Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Wolff S.P.: *Anal Biochem.* 220, 403-409 (1994).
47. Gay C.A., Gebicki J.M., *Anal Biochem* 304, 42-46 (2002).
48. Eiselt J., Racek J., Holecek V., Krejcová I., Opatrný K.: *Cas. Lek. Cesk.* 135, 691-694 (1996).

49. Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P.:
Clin. Chem. 43, 1209-1214 (1997).
50. Hendriks T., Assmann R.F.: *Med. Lab. Sci.* 47, 10-16 (1990).
51. Roman K., Vladimira M., Alexander C.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 1032-1035 (2002).
52. Largilliere C., Melancon S.B.: *Anal. Biochem.* 170, 123-126 (1988).
53. Yu L.W., Latriano L., Duncan S., Hartwick R.A., Witz G.: *Anal. Biochem.* 156,
326-333, (1986).
54. Esterbauer H., Lang J., Zadavec S., Slater T.F.: *Methods Enzymol.* 105, 319-328
(1984).
55. Korchazhkina O., Exley C., Andrew Spencer S.: *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 794, 353-62 (2003).
56. Draper H.H., Squires E.J., Mahmoodi H., Wu J., Agarwal S., Hadley M.:
Free Radic. Biol. Med. 15, 353-363 (1993).
57. Mulchandani A., Rudolph D.C., *Anal. Biochem.* 225, 277-282 (1995).
58. Poirier B., Michel O., Bazin R., Bariety J., Chevalier J., Myara I.:
Nephrol. Dial. Transplant. 8, 1598-1606 (2001).
59. Recknagel R.O., Glende E.A.: *Methods Enzymol.* 105, 331-337 (1984).
60. Cathcart R., Schwiers E., Ames B.N.: *Anal. Biochem.* 134, 111-116 (1983).
61. Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U., Barclay L.R., Locke S.J.:
Biochim. Biophys. Acta. 924, 408-419 (1987).
62. Earl R.S., Barbara S.B.: *Free radical toxicology* 5, 71 – 87 (1997).
63. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M.: *Diabetes* 52, 1-8 (2003).
64. Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E., Altun M.: *Free Rad. Res.* 39, 949-961
(2005).
65. Recknagel R.O., Glende E.A.: *Methods Enzymol.* 105, 331-337(1984).
66. Sibmooh N, Yamanont P, Krudsood S, Leowattana W, Brittenham G,
Looareesuwan S, Udomsangpetch R: *Lipids. Health. Dis.* 3, 3-15 (2004).
67. Gebicki J.M., Du J., Collins J., Tweeddale H.: *Acta Biochim. Pol.* 47, 901-911 (2000).
68. Tribble D.L., Rizzo M., Chait A., Lewis D.M., Blanche P.J., Krauss R.M.:
Am. J. Med. 110, 103-110, (2001).
69. Wieland H., Seidel D.: *J. Lipid. Res.* 24, 904-909 (1983).
70. Banerjee D., Madhusoodanan U.K., Sharanabasappa M., Ghosh S., Jacob J.:
Clin. Chim. Acta. 337, 147-52 (2003).

71. Gay C.A., Gebicki J.M.: *Anal. Biochem.* 304, 42-46 (2002).
72. Ho K.M., Dobb G.J., Knuiman M., Finn J., Lee K.Y., Webb S.A.: *Crit. Care.* 10, 4-12 (2005).
73. Benoist J.F., Mimoz O., Assicot M., Edouard A.: *Clin. Chem.* 44, 1778-1779 (1998).
74. Keen R.R., Stella L., Flanigan D.P., Lands W.E.: *Crit. Care Med.* 19, 1114-9 (1991).
75. Goode H.F., Cowley H.C., Walker B.E., Howdle P.D., Webster N.R.:
Crit. Care Med. 23, 616-617 (1995).
76. Nuttall S.L., S. Newton S., Piper M.K., Martin U., Gordon C.: *Rheumatology (Oxford)* 42, 758-762 (2003).
77. Davi G., Falco A, Patrono C, *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 256-268 (2005).
78. Abramson J.L., Hooper W.C., Jones D.P., Ashfaq S., Rhodes S.D., Weintraub W.S., Harrison D.G., Quyyumi A.A., Vaccarino V.: *Atherosclerosis.* 178, 115-121 (2005).
79. Wilson R.F., Barletta J.F., Tyburski J.G., *Crit. Care.* 7, 413-415 (2003).
80. van Leeuwen H.J., Heezius E.C., Dallinga G.M., van Strijp J.A., Verhoef J., van Kessel K.P.: *Crit. Care Med.* 31, 1359-1366 (2003).
81. Chien J.Y., Jerng J.S., Yu C.J., Yang P.C.: *Crit. Care Med.* 33, 1688-1693 (2005).
82. Vermont C.L., den Brinker M., Kakeci N., de Kleijn E.D., de Rijke Y.B., Joosten K.F., de Groot R., Hazelzet J.A.: *Crit. Care Med.* 33, 1610-1615 (2005).
83. Giese S.P., Pearson J., Firth C.A.: *Free Radic. Res.* 37, 983-991 (2003).
84. Craig W.Y., Rawstron M.W., Rundell C.A., Robinson E., Poulin S.E., Neveux L.M., Nishina P.M., Keilson L.M.: *Arterioscler. Thromb. Vas.c Biol.* 19, 1512-1519 (1999).
85. Stait S.E., Leake D.S.: *Biochem. J.* 320, 373-381 (1996).
86. Huang J.M., Huang Z.X., Zhu W.: *Clin. Biochem.* 31, 537-543 (1998).
87. Solakivi T., Jaakkola O., Salomaki A., Peltonen N., Metso S., Lehtimaki T., Jokela H., Nikkari S.T.: *Lipids Health Dis.* 20, 4-25 (2005).
88. Parthasarathy S., Barnett J., Fong L.G.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1044, 275-283 (1990).

Svoluji k zapůjčení této diplomové práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení , adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka